

Práctica de laboratorio : desarrollo de un biosensor de cobre



Maria Mercedes Roca
Departamento de Bioingeniería y Biotecnología
Tecnológico de Monterrey

**Principios de ingeniería
genética
y biología sintética
en microorganismos**

Dr. Paul Jaschke
Endy Lab
Dept. Bioengineering
Stanford University



El cambio climático agudiza la roya del café y el uso de fungicidas a base de cobre (permitidos en la agricultura orgánica)



Procedimiento

Para aplicar los tres fungicidas que repartirá el Maga a los pequeños caficultores se deben tomar en cuenta varios aspectos de seguridad.

Aplicaciones:

- La primera debe hacerse durante los **primeros 15 días de mayo**.
- La segunda, a los **45 días**.
- La tercera, a los **90 días**.



Evitar el contacto directo con los fungicidas.

Fuente: Maga, Agrequiima.

Aplicar el fungicida con boquillas adecuadas para la aspersión (TJ608003VS o TJ6010003VS)

Proteger los ojos

Cubrir la boca y la nariz con mascarilla

Usar bomba de mochila

Usar guantes de látex o de nitrilo

Proteger los pies con botas de hule

Usar un traje adecuado o fabricar uno con nailon

Contaminación de agua por cobre en Mesoamérica

Contaminación de lagos



Es posible monitorear contaminantes ambientales
de forma fácil y con bajo costo?

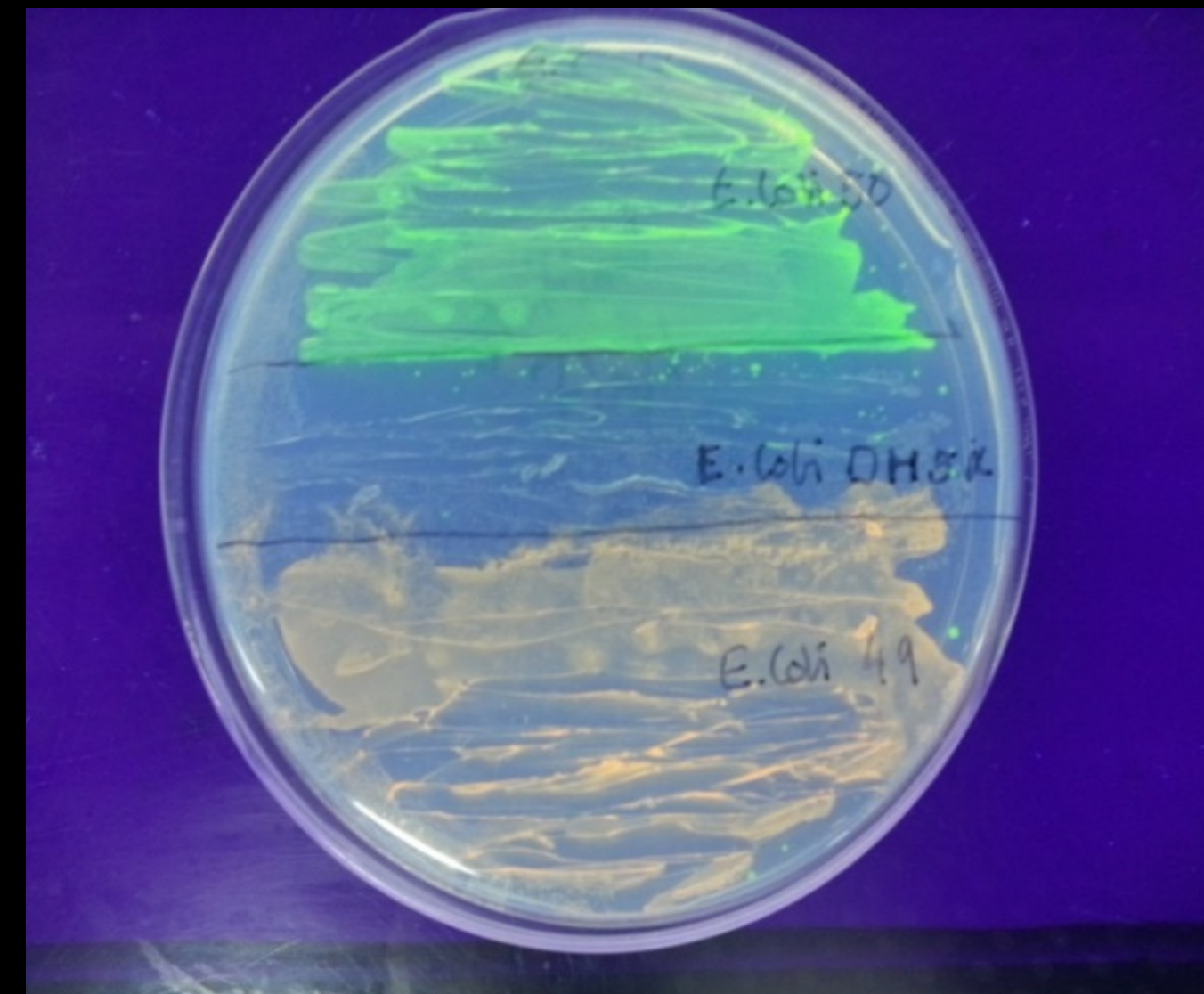
Objetivos de aprendizaje

Al terminar la práctica de dos días, serás capaz de:

- Entender principios básicos del uso de sensores biológicos (biosensores) para la detección de contaminantes en agua a causa de la contaminación por plaguicidas
- Desarrollar habilidades de técnica ascéptica; pipetear sin errores; desechar adecuadamente desechos biológicos (biocontención)
- Entender los principios básicos de la transformación genética (insertar ADN foráneo) en microrganismos por ingeniería genética
- Entender los principios básicos de la biología sintética: como programar el genoma un microorganismo para producir una nueva proteína

Synthetic biology :

“ the domestication and democratization ” of biotechnology



Práctica de laboratorio (2 días)

Día 1:

1. Orientación general de procedimiento, equipo y reactivos de laboratorio
2. Preparar células bacterianas competentes (capaces de absorber ADN)
3. Transformar la bacteria con el plásmido (insertar ADN en la célula)
4. Explicación de detalles experimentales
5. Terminar práctica

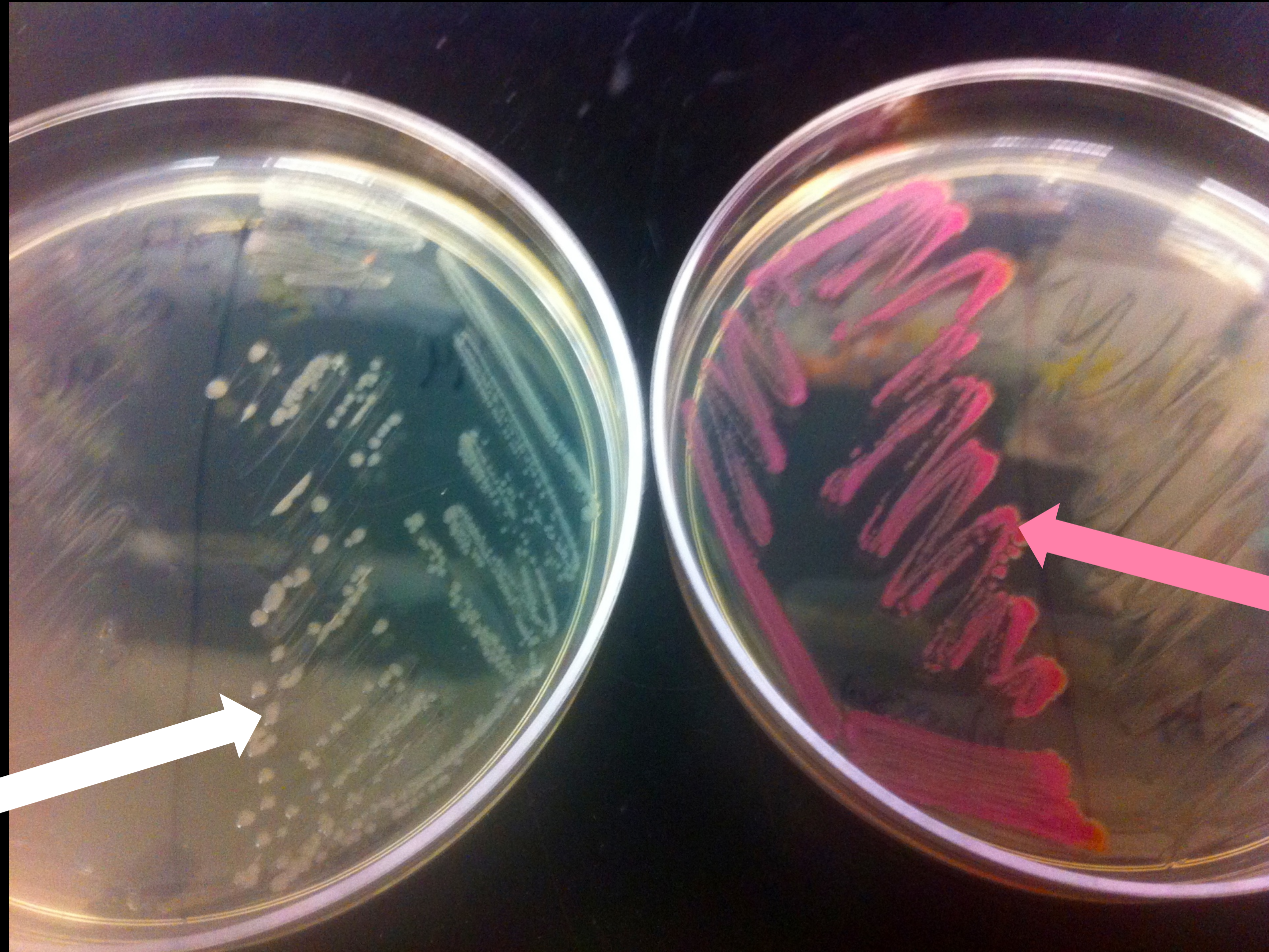
Día 2 :

1. Evaluar la bacteria transformada y discutir su significado
2. “Bautizar” a la nueva bacteria

Biosensor para la detección de cobre

Bacteria E.coli
Cepa DH5 Δ Z1

Color crema

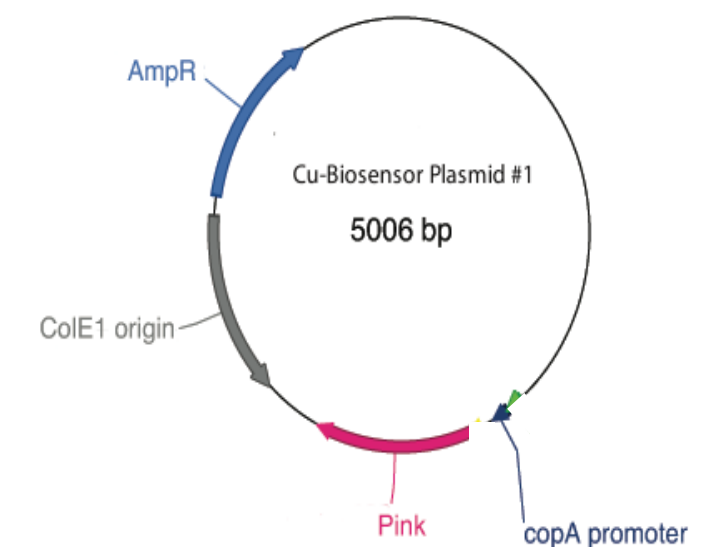


**Bacteria E.coli
transformada**

Color **rosa** (solo en
presencia de cobre)

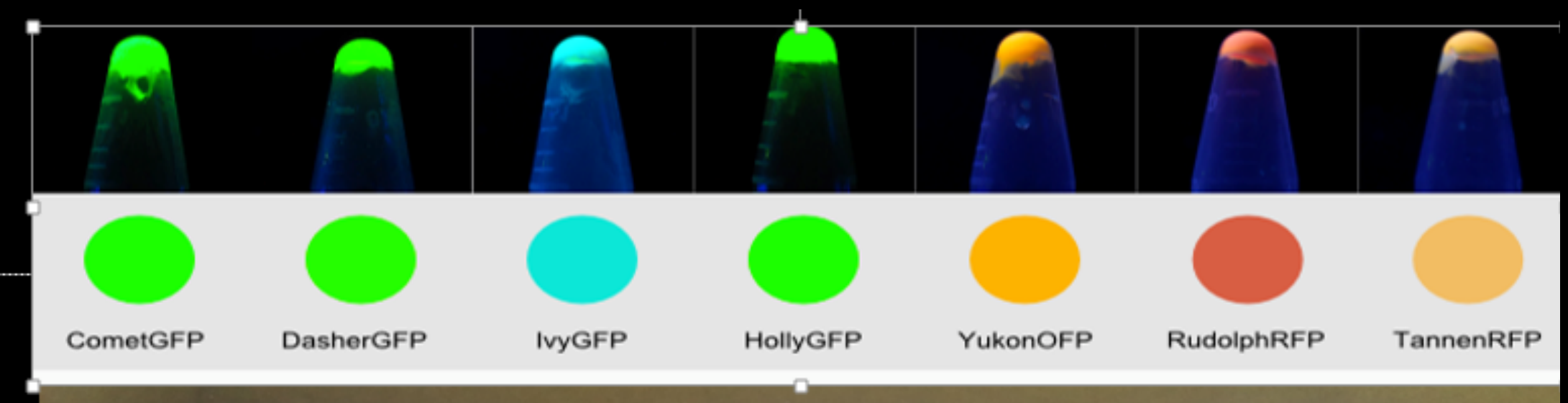
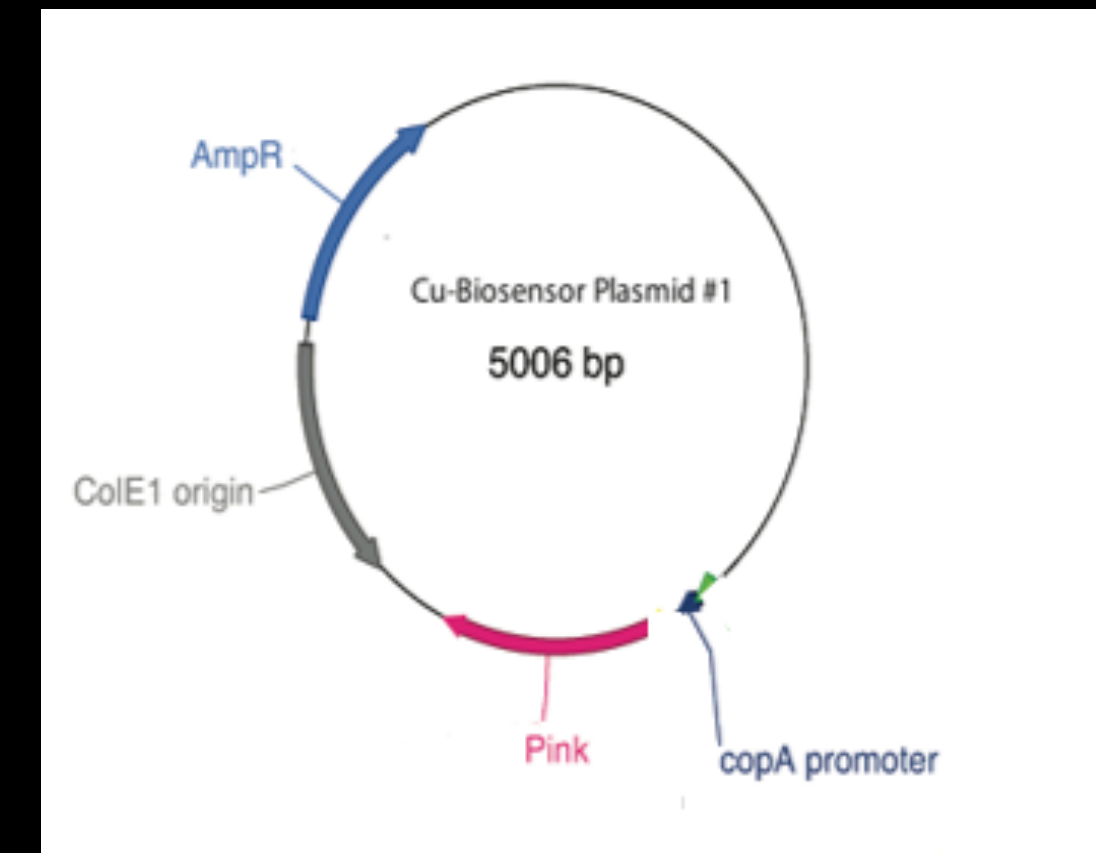


Introducción de plásmido
(ADN circular con genes de
interés)

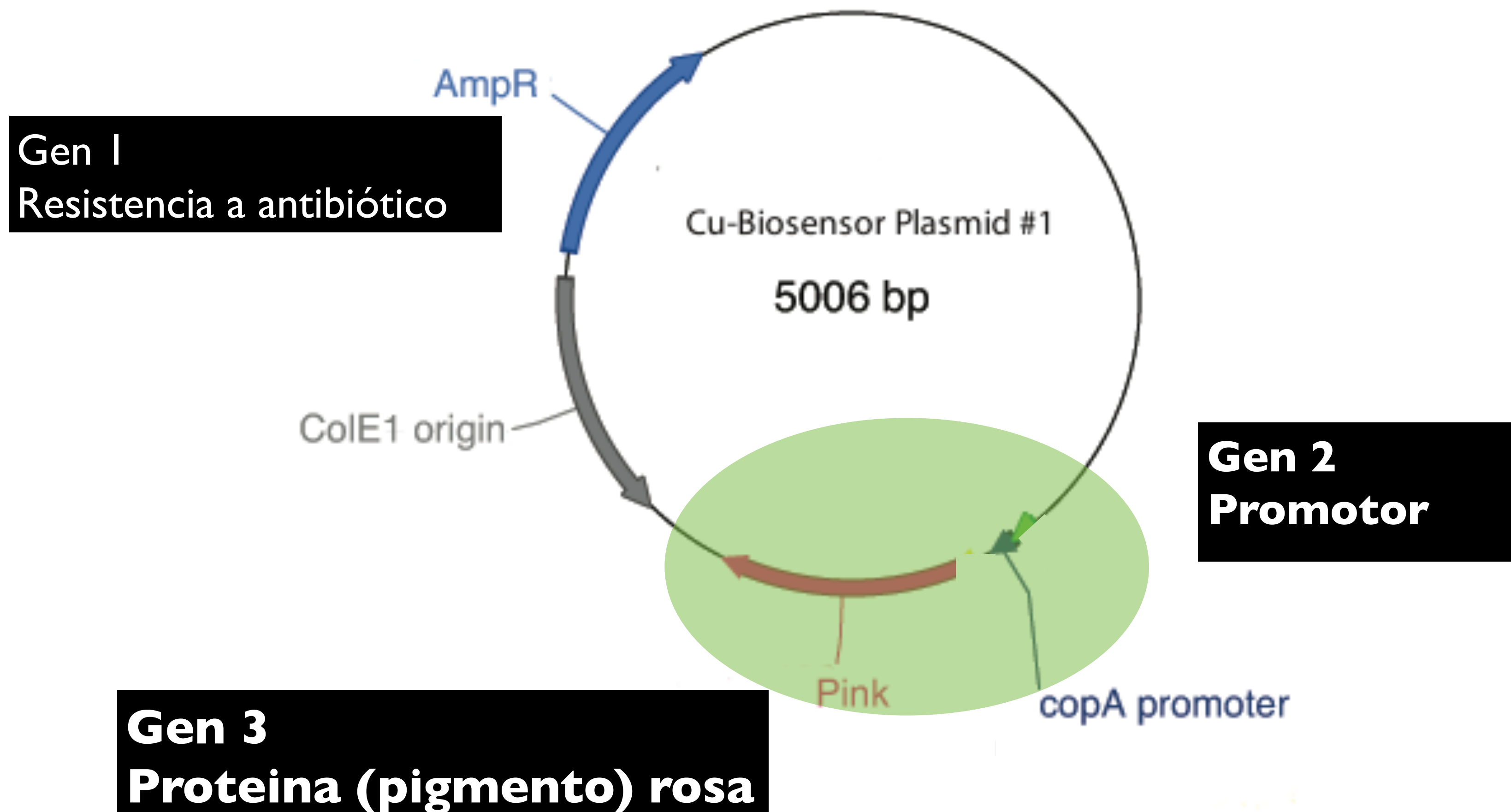


Que necesitamos ?

- La bacteria (*E. Coli*)
- Un plásmido (ADN circular, vehiculo para insertar ADN en la bacteria)
- Genes de interés
 - Gen CopA (permite a *E.Coli* crecer en presencia de cobre)
 - Gen de pigmento que nos permite visualizar la bacteria que tenga el gen de interes



El plásmido de hoy: biosensor de cobre



Seguridad en el laboratorio

Biodesechos vs. desechos normales

- No es necesario usar guantes ni gabachas para este laboratorio
- *E. coli* - nivel de bioseguridad I – la mas baja, ya que no es patogénica
- (Es importante mantener ascepcia para evitar la contaminación de nuestro biosensor)

Protocolo día 1:

Preparación química de células competentes

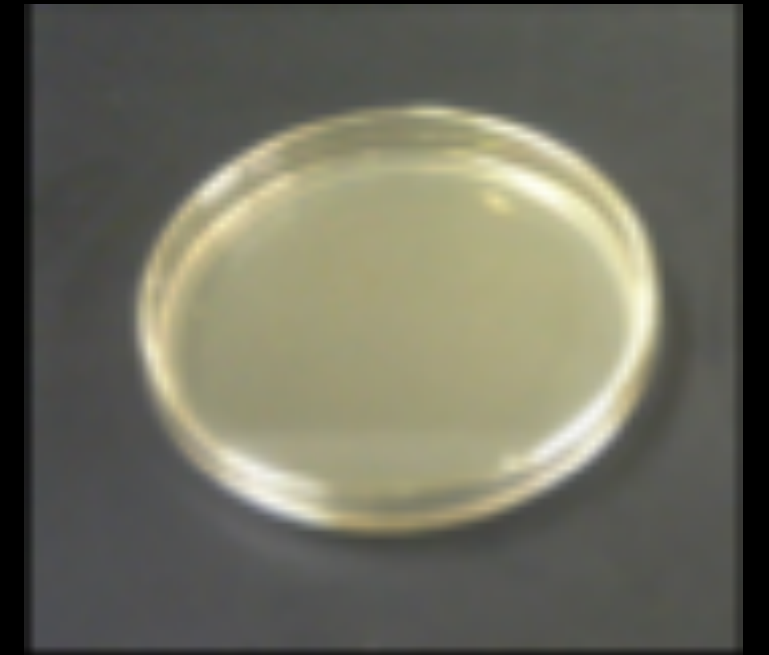
1. Preparar el cultivo de E. coli la noche anterior en medio LB (frasco Erlen meyer de 200 ml con agitación, rango temp. 25 - 35 °C)
2. El día 1 diluir el cultivo en medio LB fresco en frasco Erlen meyer de 100 ml
3. Preparar buffer TSS pH 6.5 (mantener a 4 °C) la noche anterior
4. Preparar tubos eppendorf de 1.5 ml y rotular (mantener a 4 °C)
5. Incubar cultivo de E.coli por 10 min a 4°C

Equipo

Frascos



Platos Petri x 3



Mechero



Incubadora/shaker



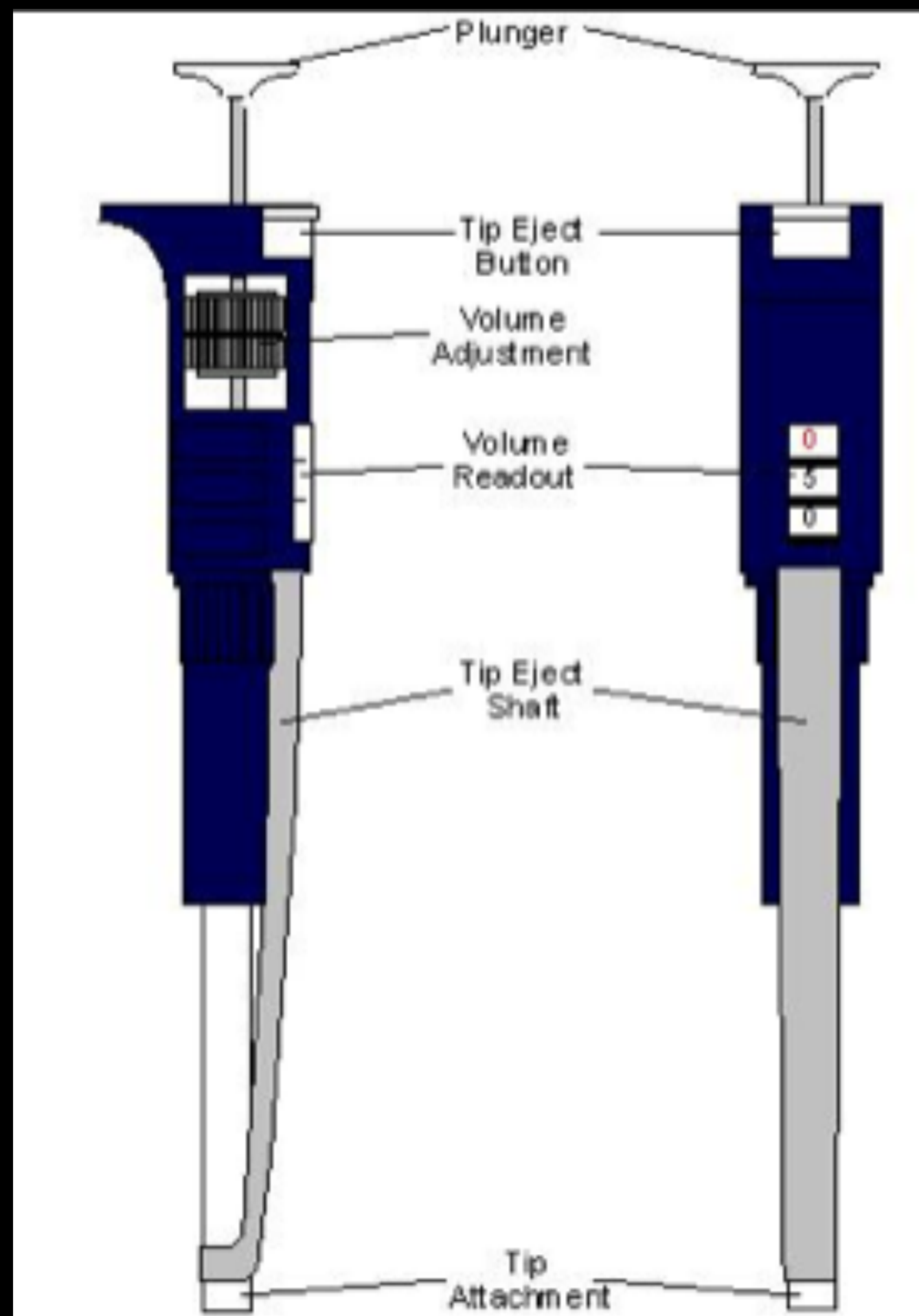
Microtubos/
eppendorf



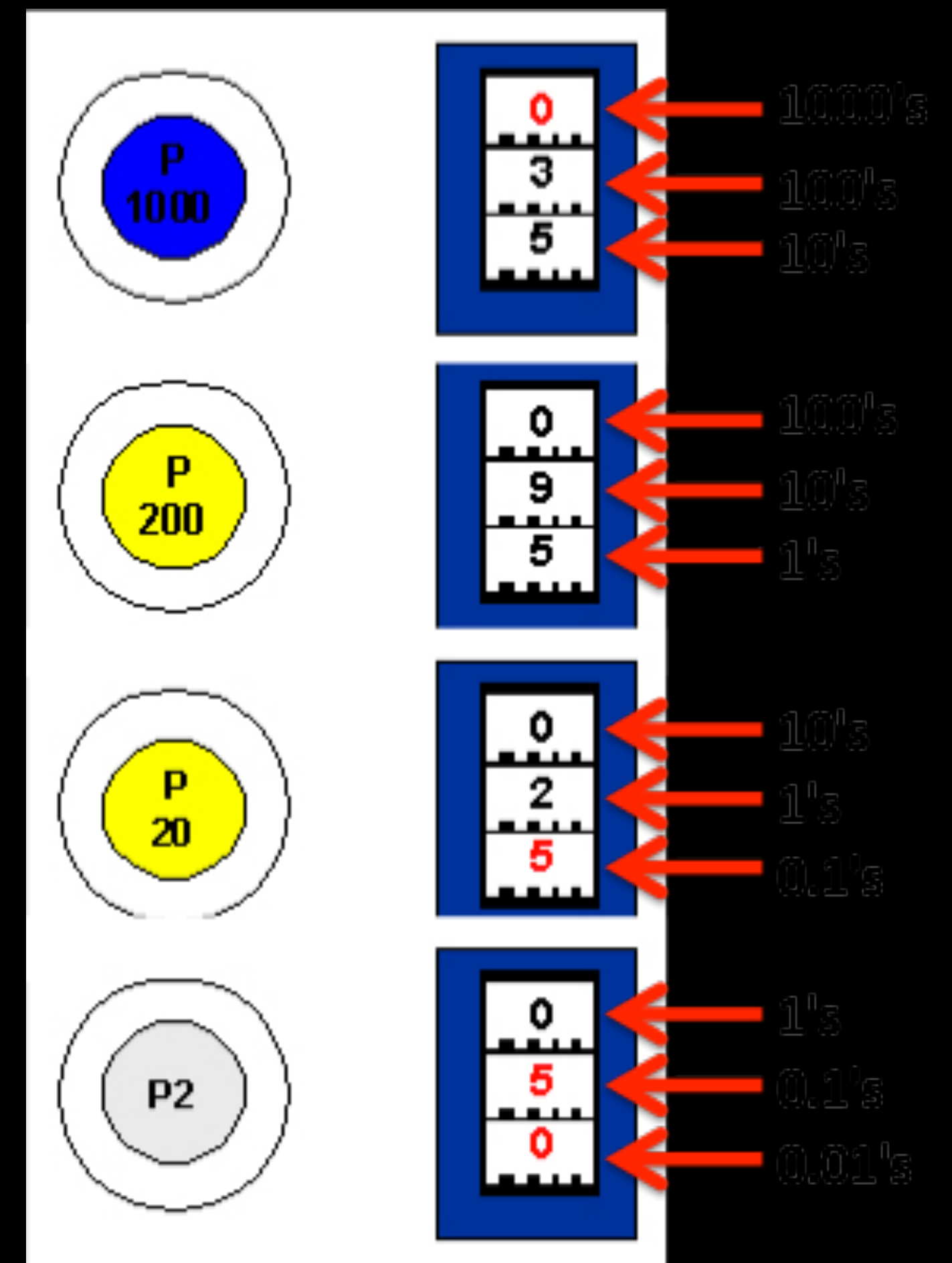
Autoclave



Micropipetteas



No use una
medida
mayor al
P-number
de la pipeta!



Como pipetear (con cuidado...)

1. Empuje suavemente el extremo de la pipeta
2. Empuje el barril (plunger) hasta el nivel stop #1.
3. Inserte la punta en el líquido
4. Suavemente suelte el barril a la posición inicial
5. Saque la punta fuera del líquido y asegúrese que no haya líquido fuera de la punta ni burbujas adentro de la punta.
6. Inserte la punta en el tubo o donde quiera depositar el líquido
7. Empuje el barril hasta la posición stop #1 (sale la mayoría del líquido)
8. Continúe empujando el barril hasta la posición stop #2 (blow out)
9. Saque la punta del líquido y suavemente suelte el barril hasta la posición inicial

Técnica estéril / aséptica

Las bacterias están en todas partes

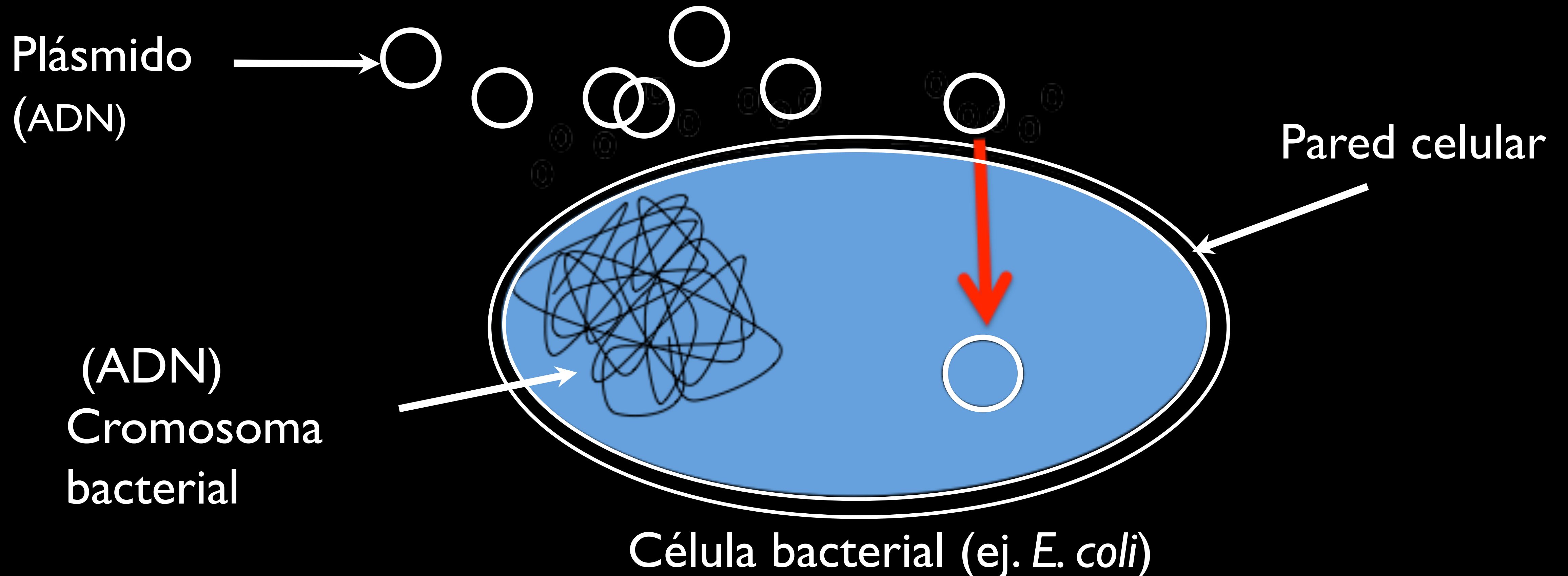
Para prevenir que contaminen su platos y tubos:

1. Minimize el tiempo que estén expuestos al aire
2. Use equipo estéril
3. Si toca una superficie no estéril con una punta estéril, deséchela !
4. Use a una punta nueva cada vez.

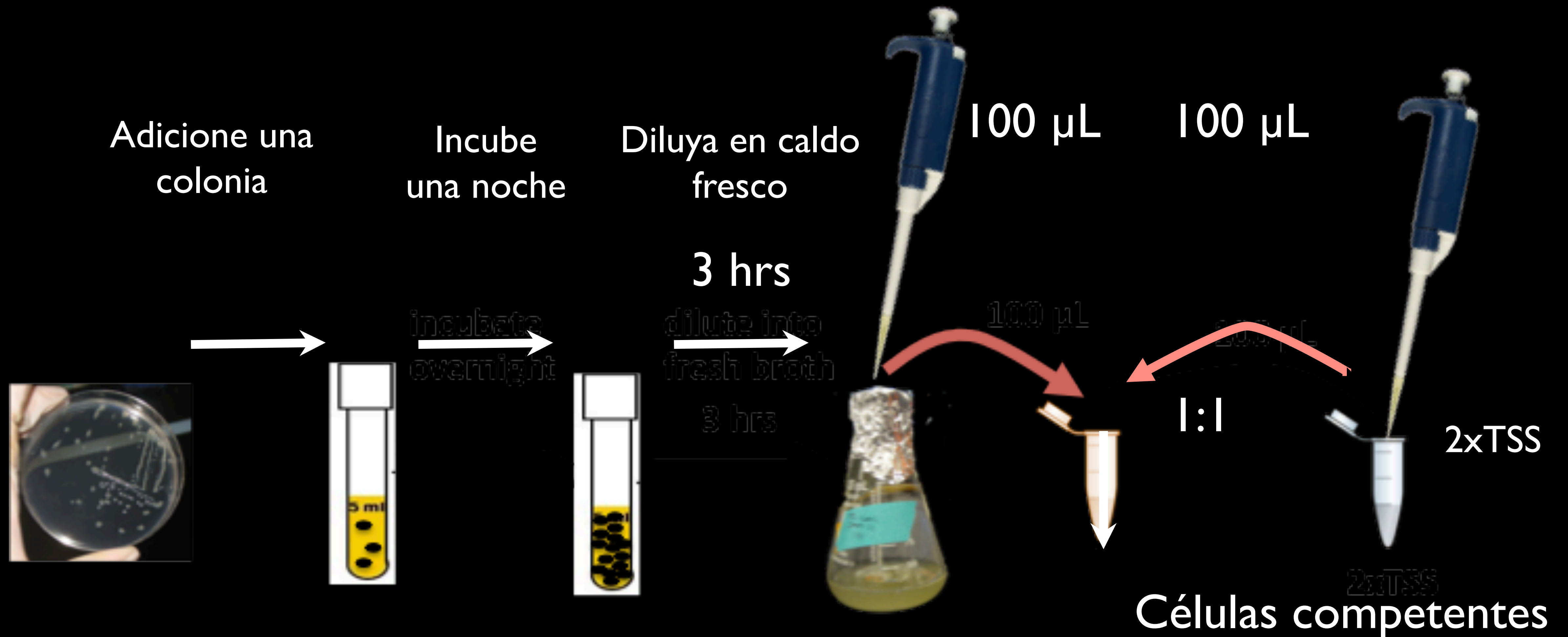
Preparación de células (bacteria) competentes
con el plásmido (ADN)

“Bacterial Competence” y transformación

“**Competence**”: habilidad para absorber ADN foráneo

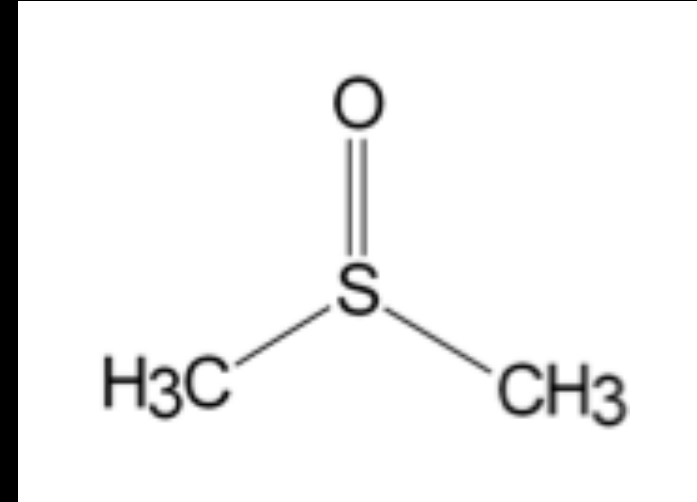


Como se hacen células competentes?

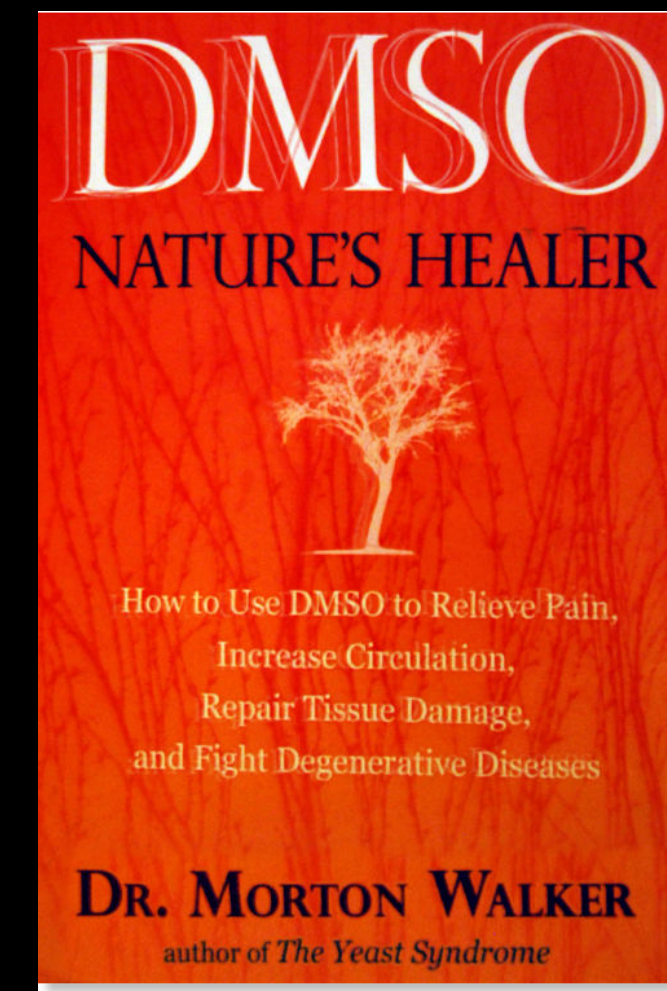
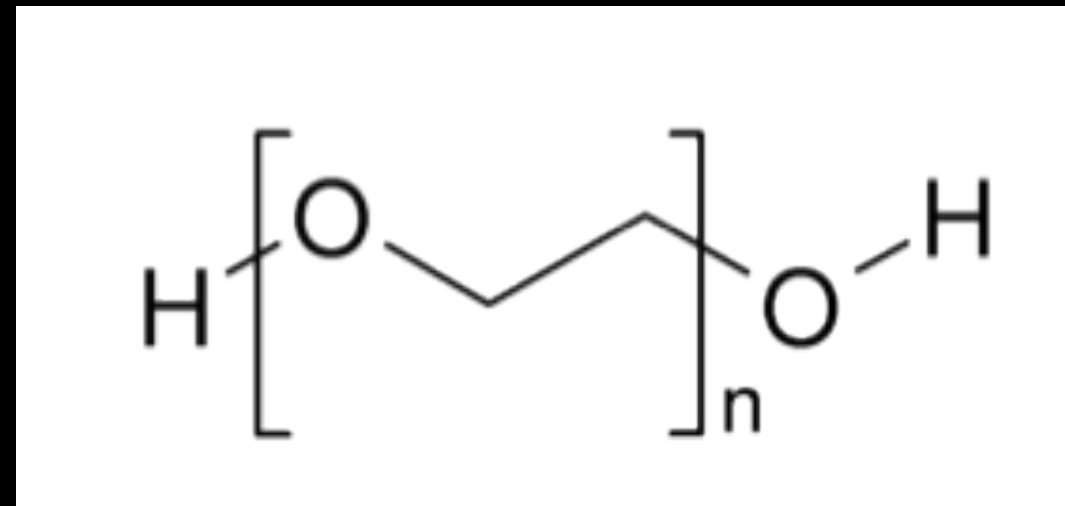


Que hay en 2xTSS ? (Transformation & Storage Solution)

PEG 3350



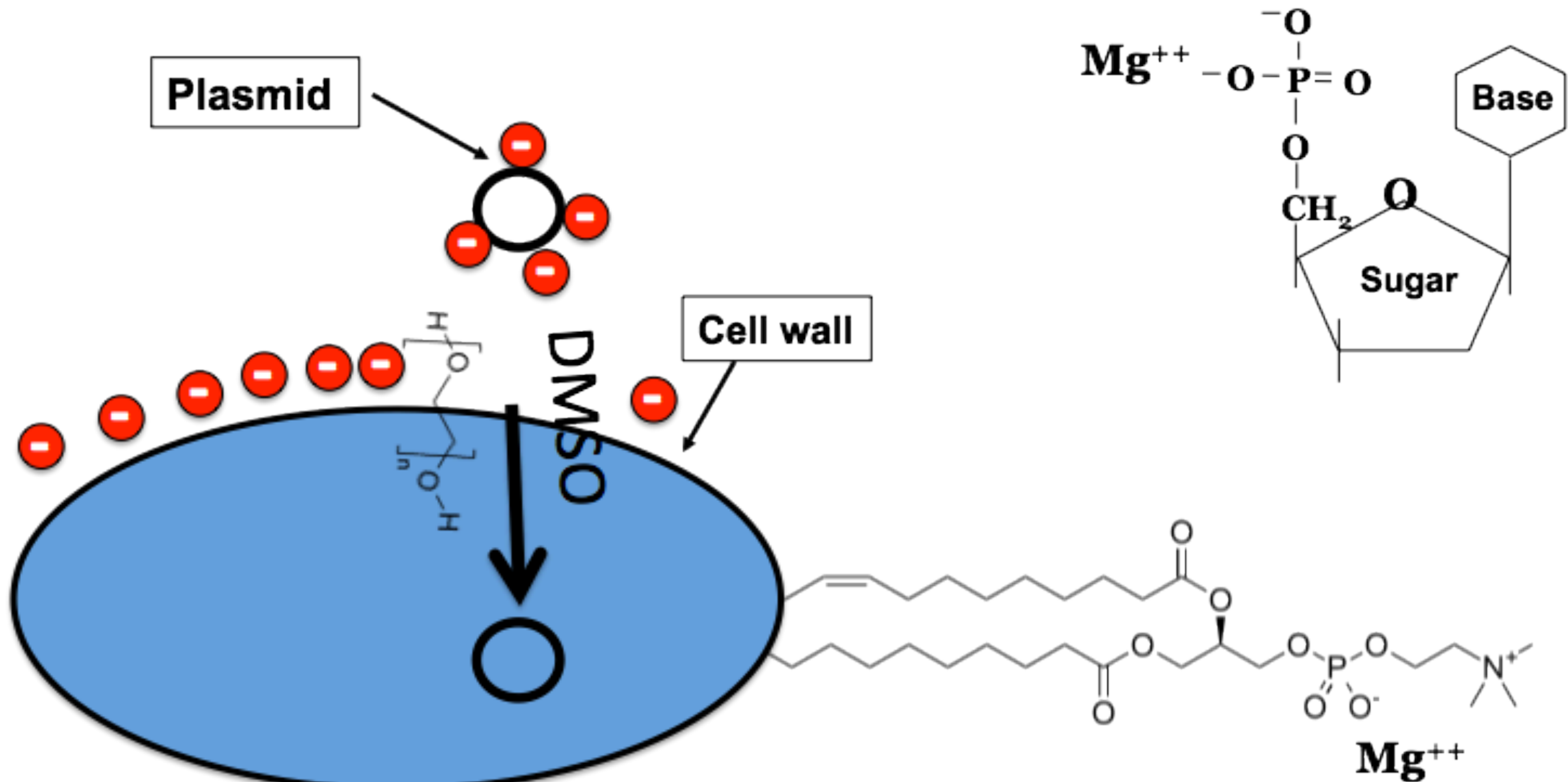
DMSO



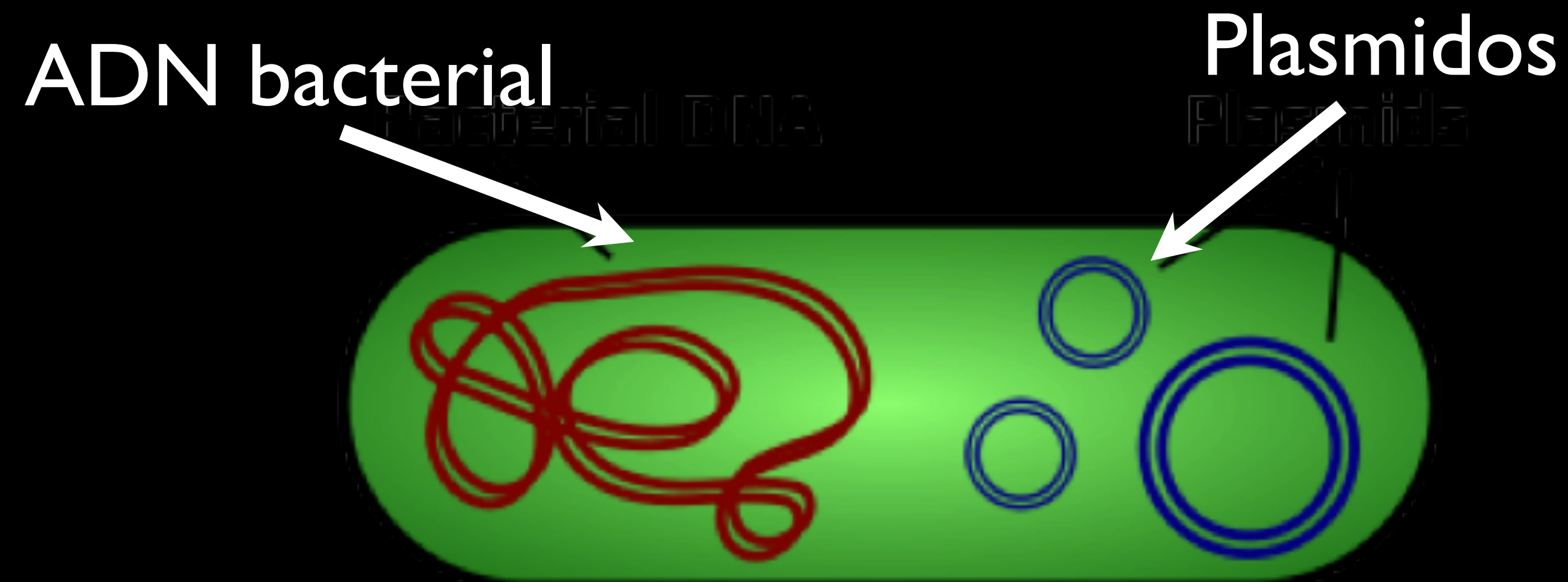
Mg²⁺

1	2											11	12	13	14	15	16	17	18
H	He											B	C	N	O	F	Ne		
Li	Be	B	C	N	O	F	Ne	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ar				
Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ar	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni		
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe		
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn		
Fr	Ra	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr			

Mecanismo de “competencia” y transformación



Que es un plásmido?



- ADN circular
- No es parte del cromosoma
- Se replica autónomamente
- Ocurre de forma natural

Ej. *Agrobacterium tumefaciens* y transformación de cultivos Bt

Que es un plasmido?

ADN bacteriana

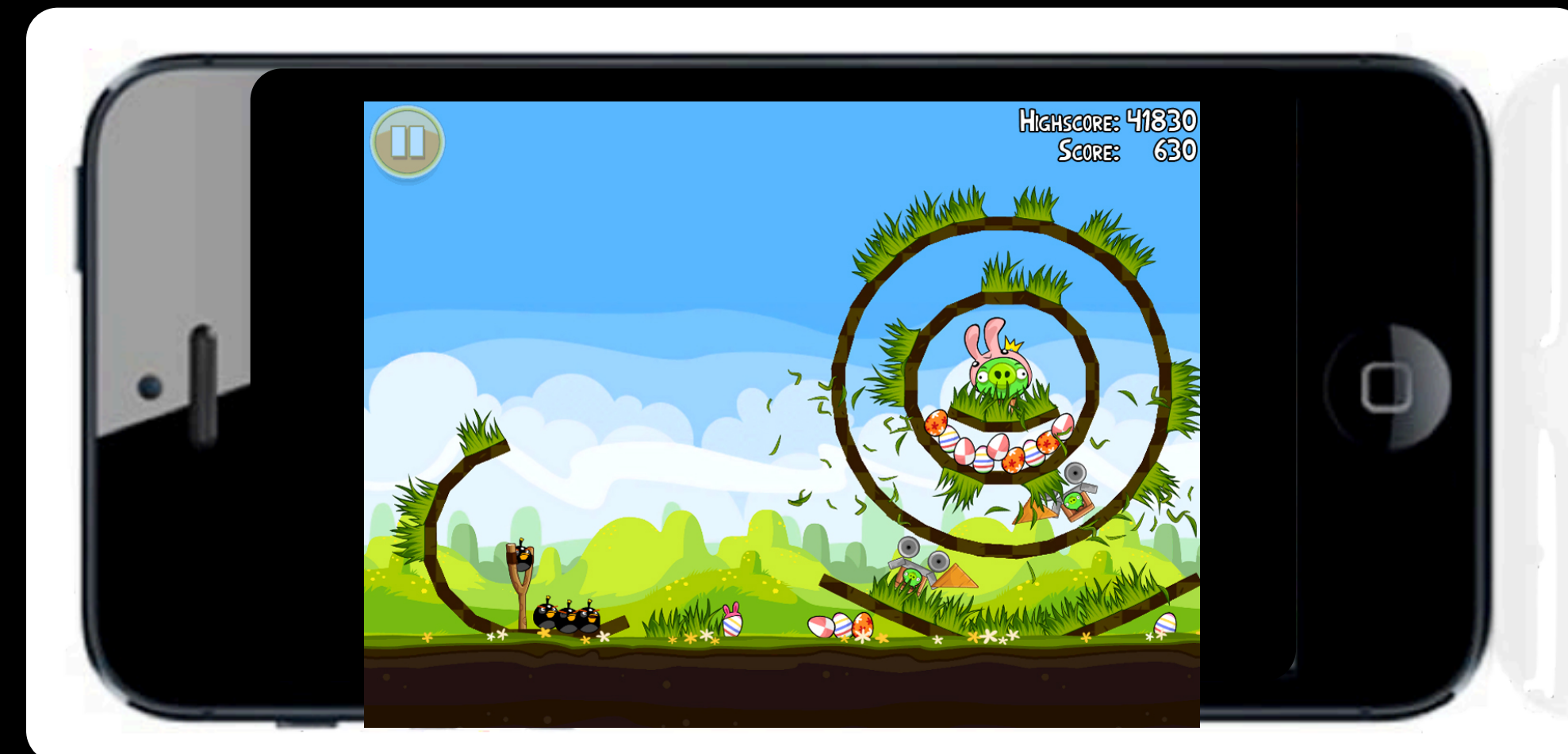
Plasmidos



- Producir biofilm
- Comer material vegetal (cellulose)



- Crecimiento
- División celular
- Comer azucar

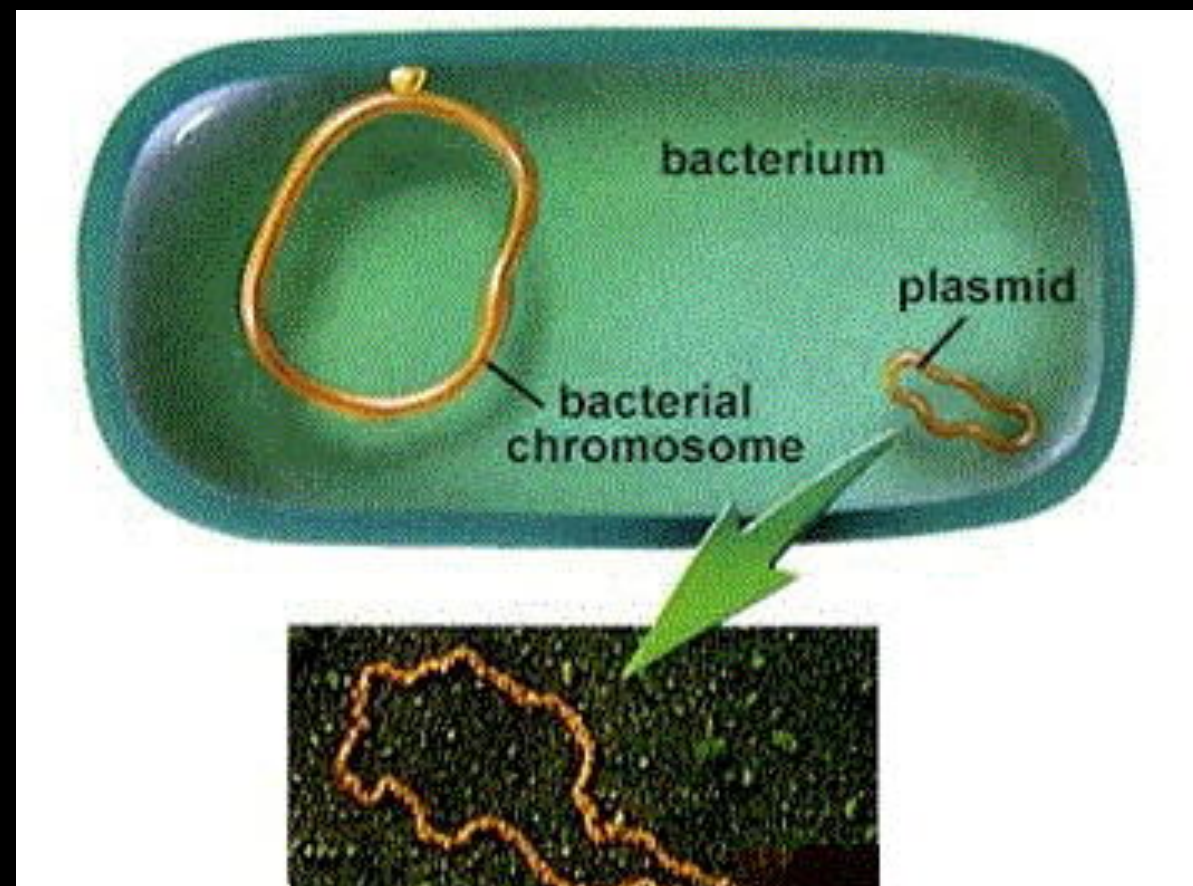


Agrobacterium tumefaciens

Una bacteria patógena del tomate

Al insertar su ADN (plásmido Ti) causa tumores en la planta

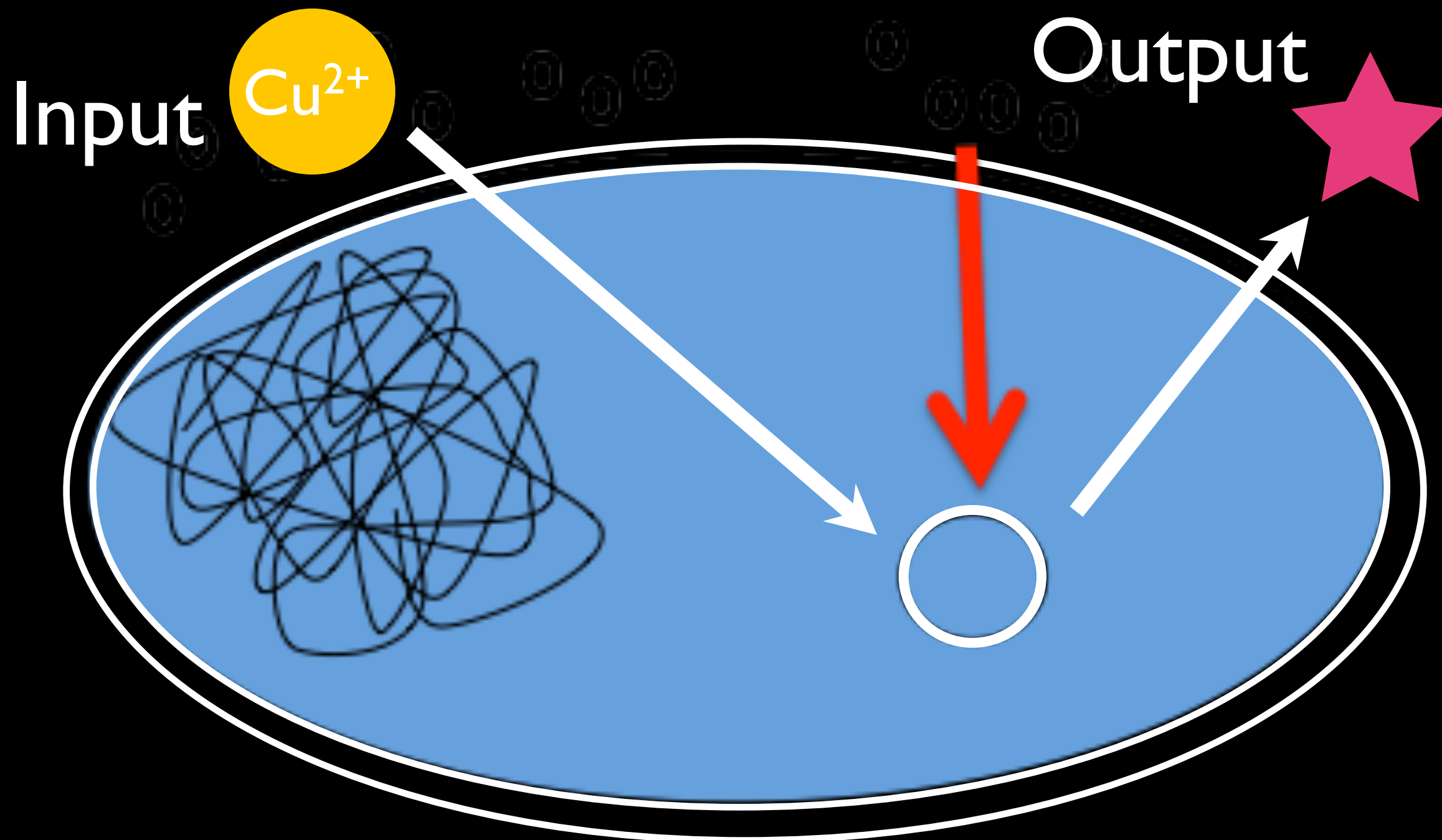
Transformación genética natural !



Transformación con *Agrobacterium tumefaciens*



Nuestro plasmido: biosensor de cobre



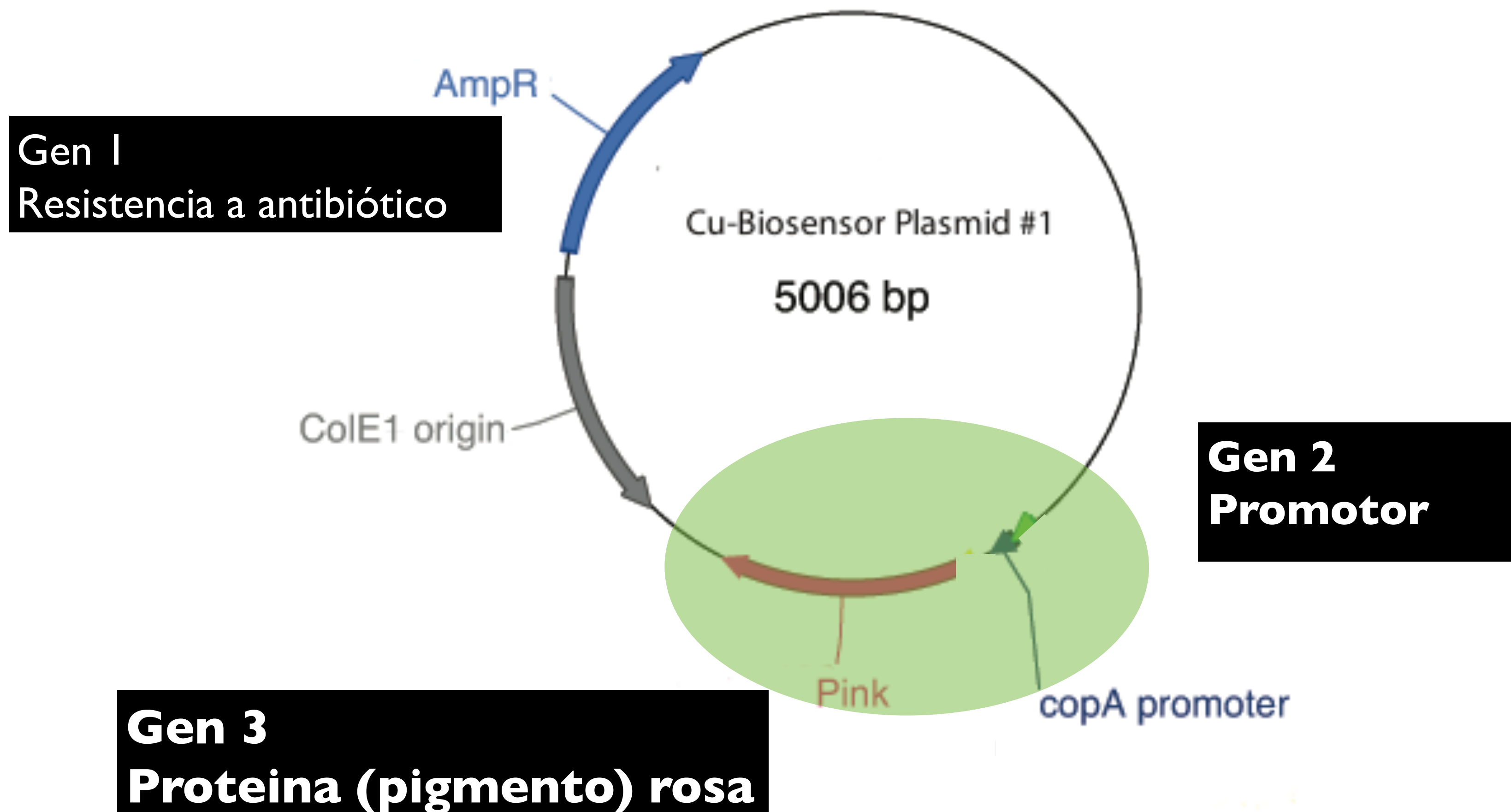
UNLEADED FUEL
**CHECK
ENGINE**



Copper?	Output
+	Con color
-	Sin color



El plásmido de hoy: biosensor de cobre

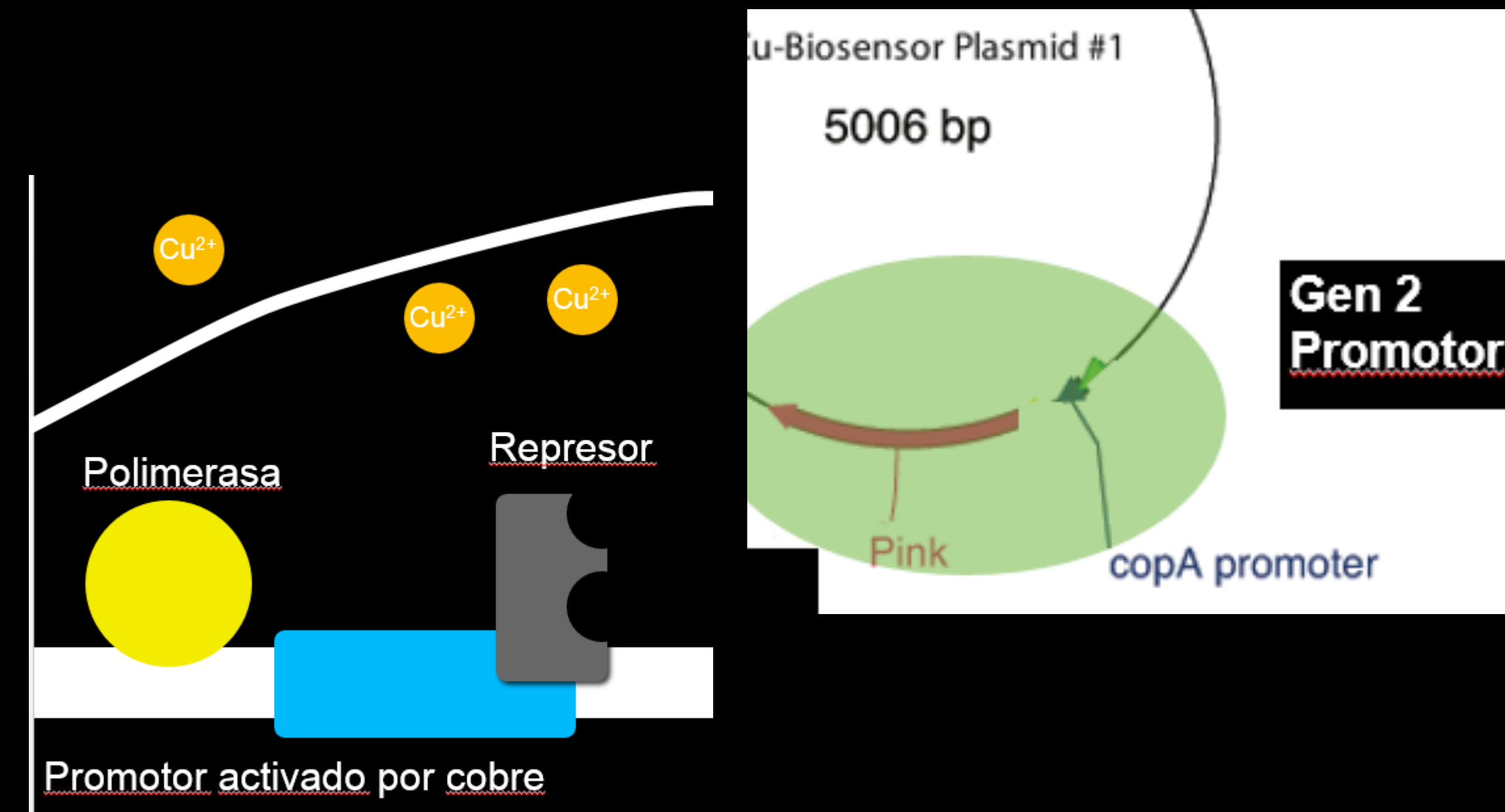


CopA promotor

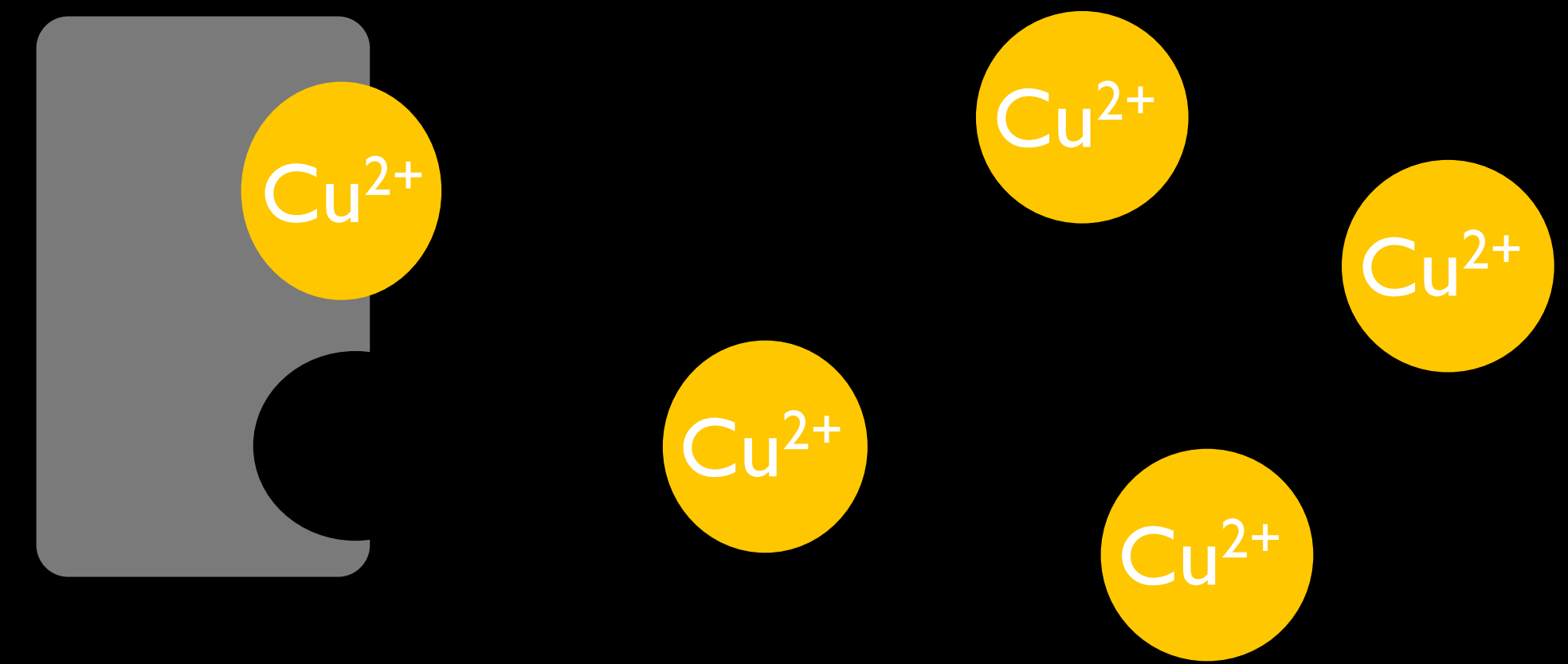
- **Promotor** :

Región corta de ADN que inicia la transcripción de un gen (en este caso gen de pigmento rosa).

- El promotor contienen secuencias específicas de ADN como elementos de control (EC). Estos EC, permiten la unión con Factores de Transcripción (FT),
- Los FT contienen secuencias específicas de ADN para activadores y represores
- En este Sistema el cobre (Cu^{2+}) es el activador



Promotor
(DNA)



Protocolo de transformación genética

- Rotule los tubos y platos (3X) con el nombre del grupo
- Mezcle 100 μ L 2xTSS con 100 μ L células bacterianas (E.coli)
- Ponga el tubo en hielo
- Adicione 10 μ L del plásmido (ADN) a las células
- Mezcle breve y suavemente invirtiendo el tubo
- Incube en hielo por 5 min
- Adicione 400 μ L medio LB

Condiciones de incubación :

Esparza 100 μ L de las células con las esferas de vidrio (suavemente de arriba a abajo)

Rotule los 3 platos petri • 15 min

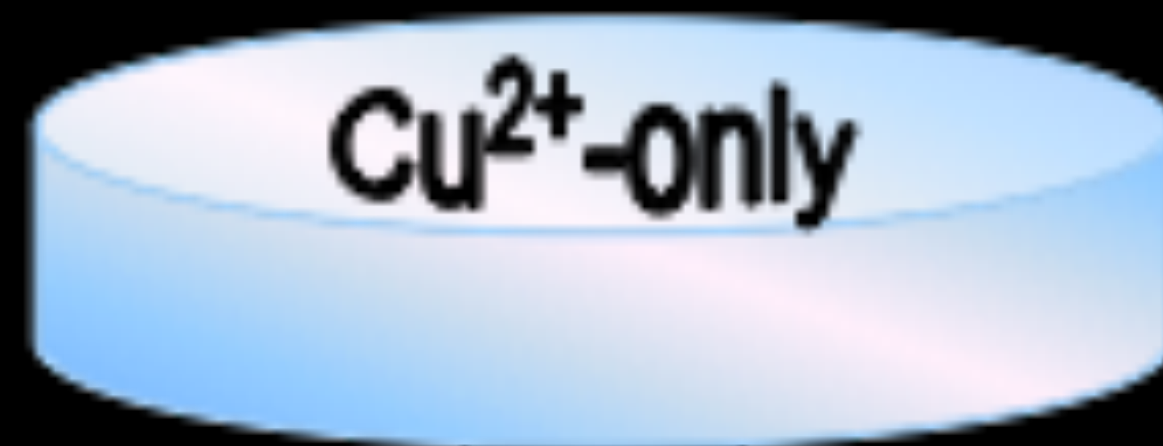
- Plato con antibiótico
- Plato con cobre
- Plato con antibiótico + cobre

Condiciones de crecimiento de bacterias transformadas

1.



2.

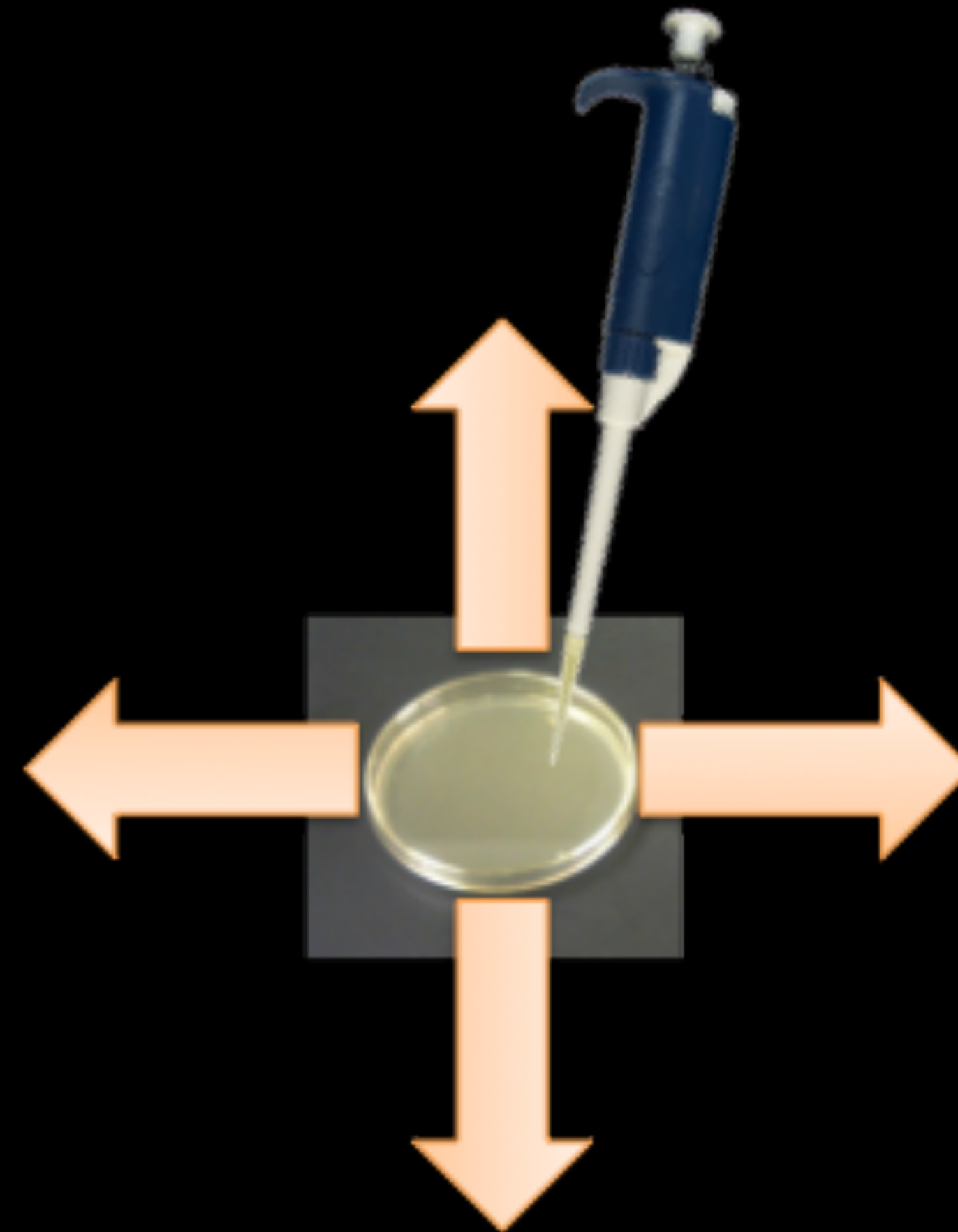


3.



Alternativa : placas con kanamicina en lugar de amplicilina

Esparciendo bacteria en placas petri



Incubar toda la noche a 37 °C

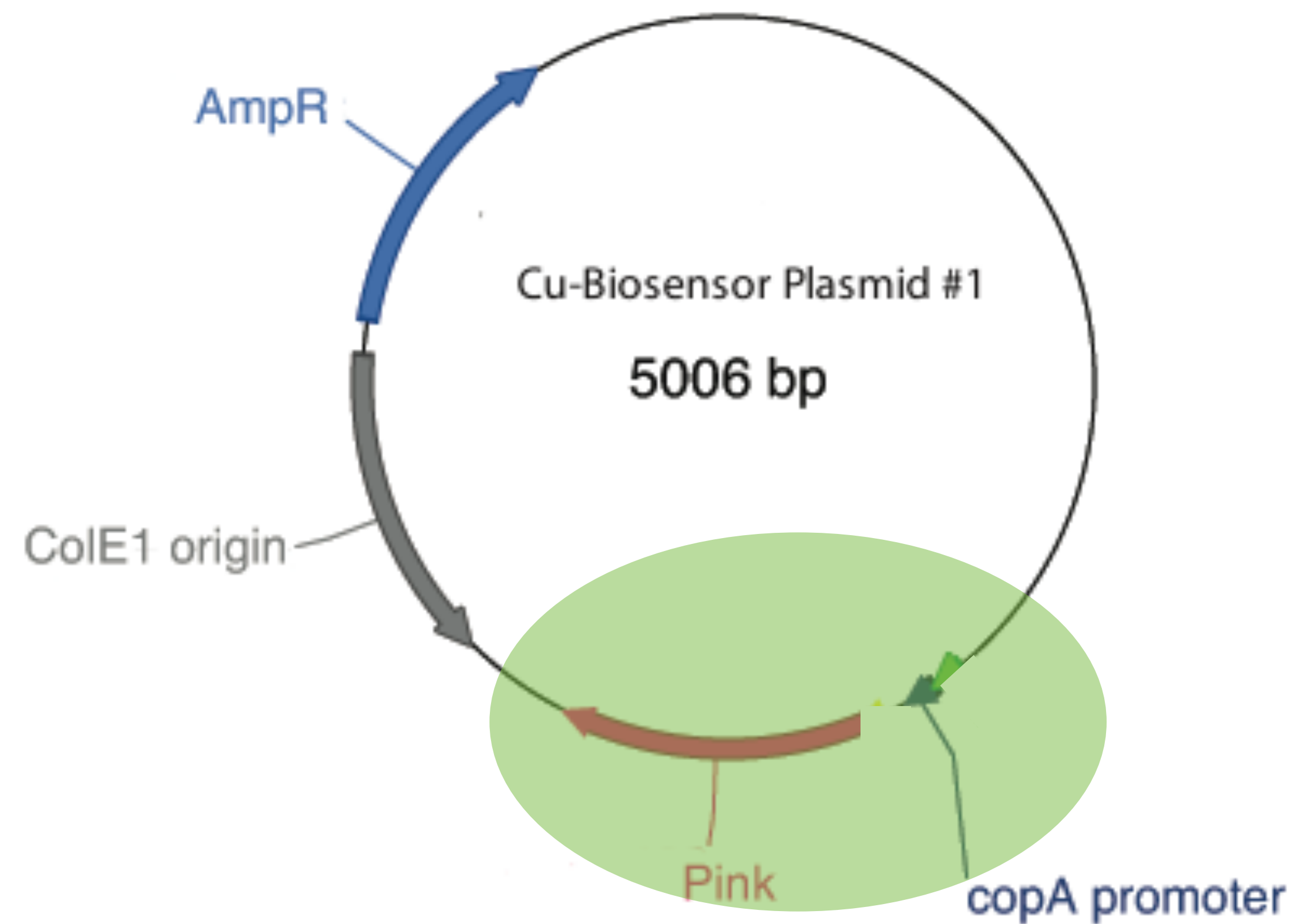
Limpiar todo !

**Desechar puntas y otros consumibles
“contaminados” por bacterias en bolsas
especiales para desechos biológicos**

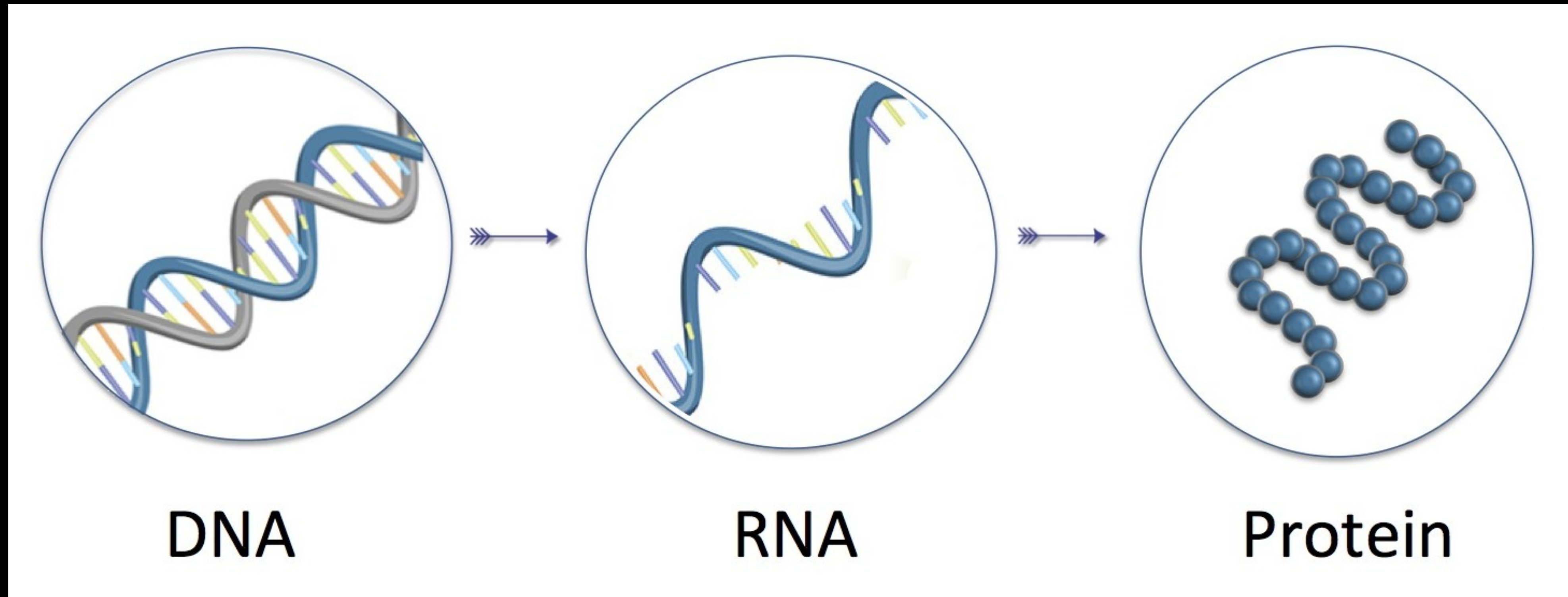
Día 2

Evaluación de resultados

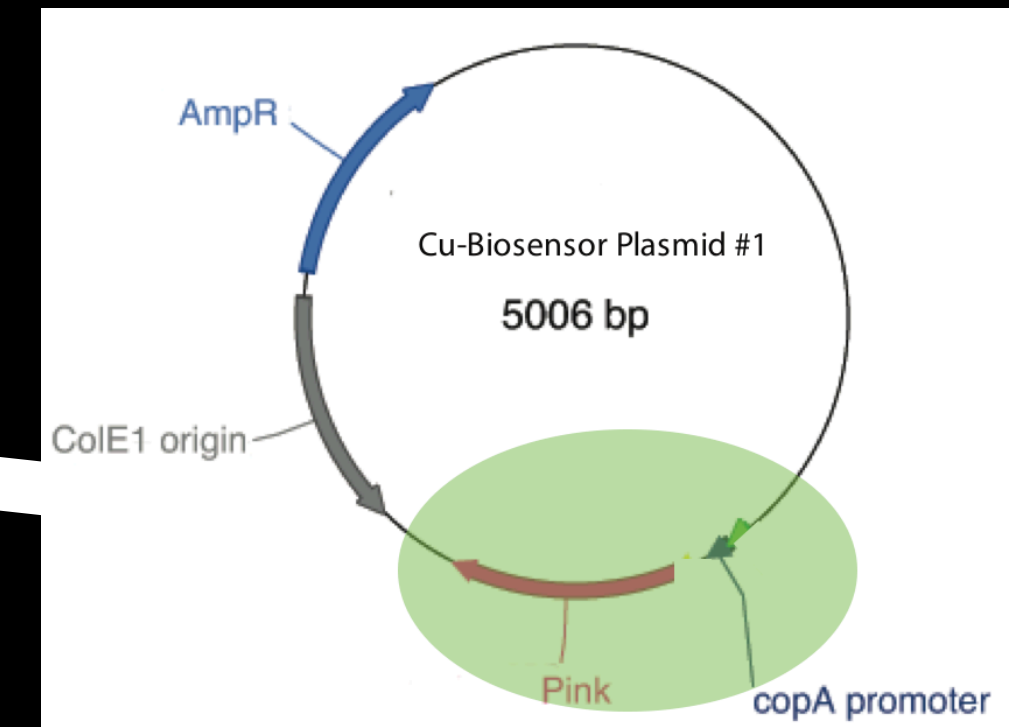
El plásmido de biosensor de cobre



Recordatorio.....Dogma Central de la Biología



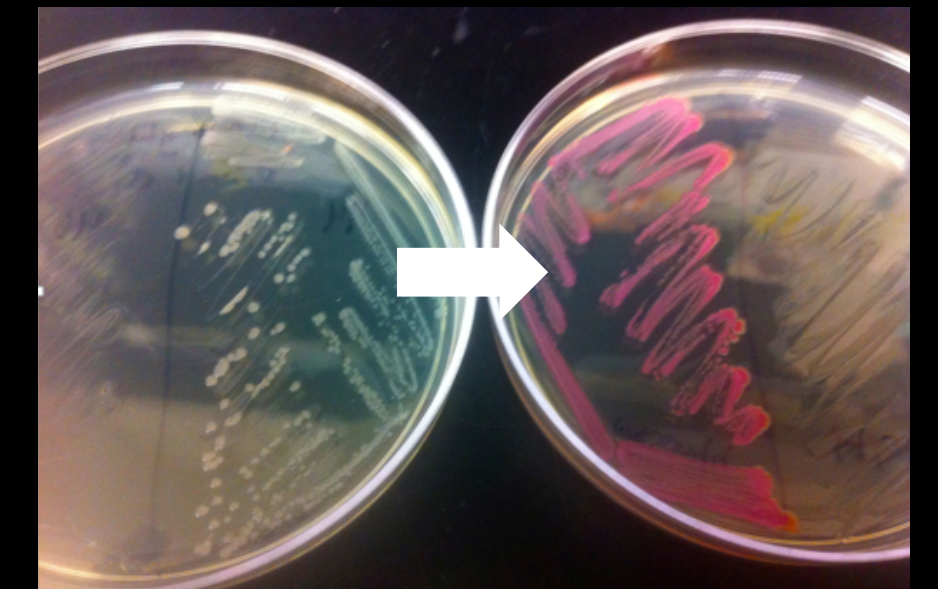
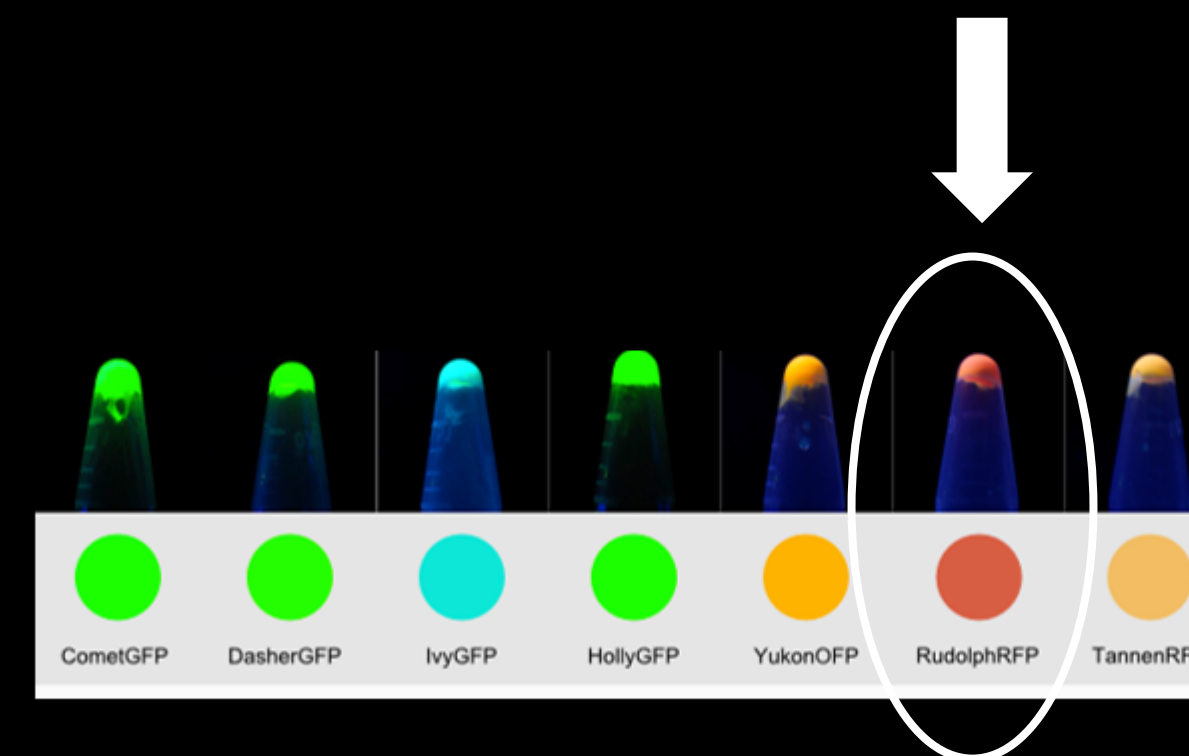
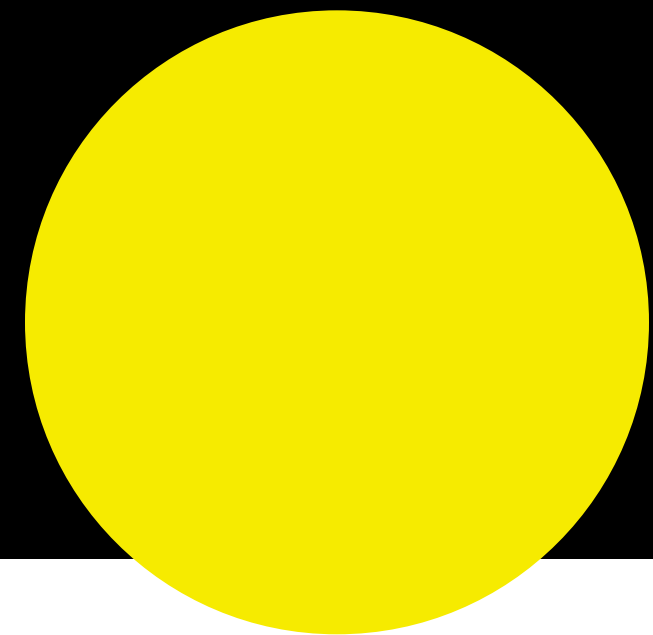
Como funciona el biosensor



Dirección de transcripción

Polimerasa

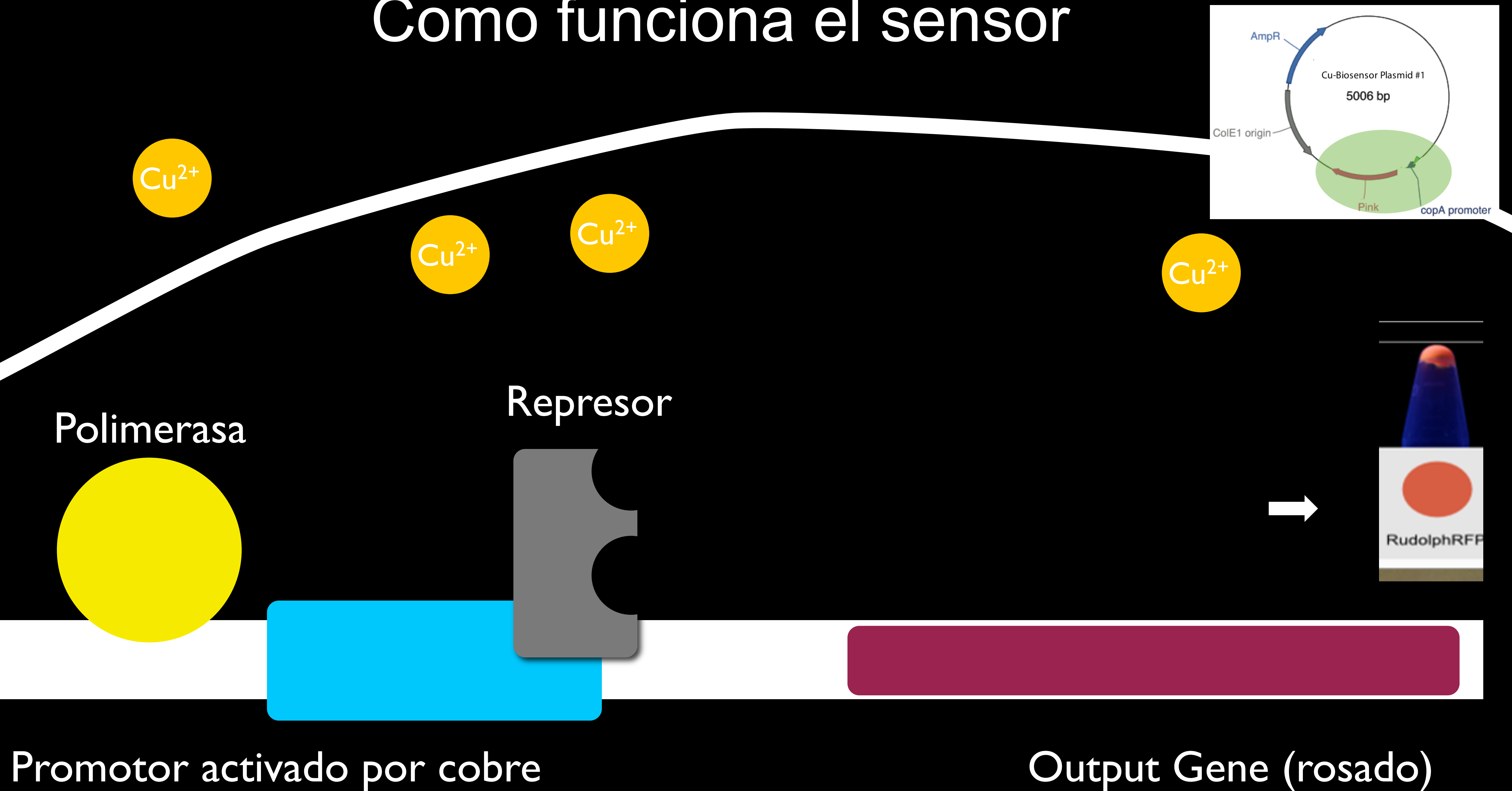
Represor



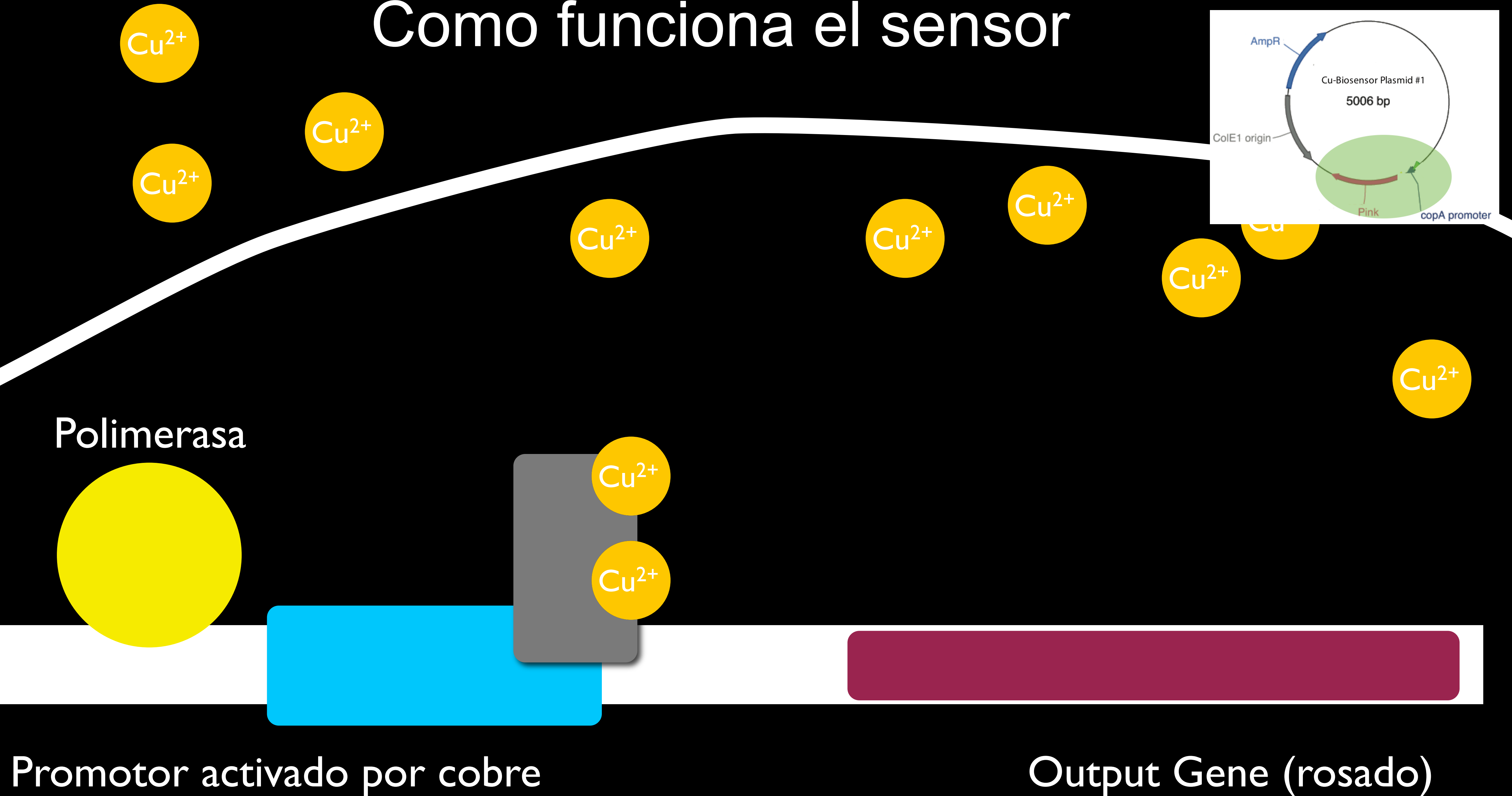
Promotor activado por cobre

Output Gene (rosado)

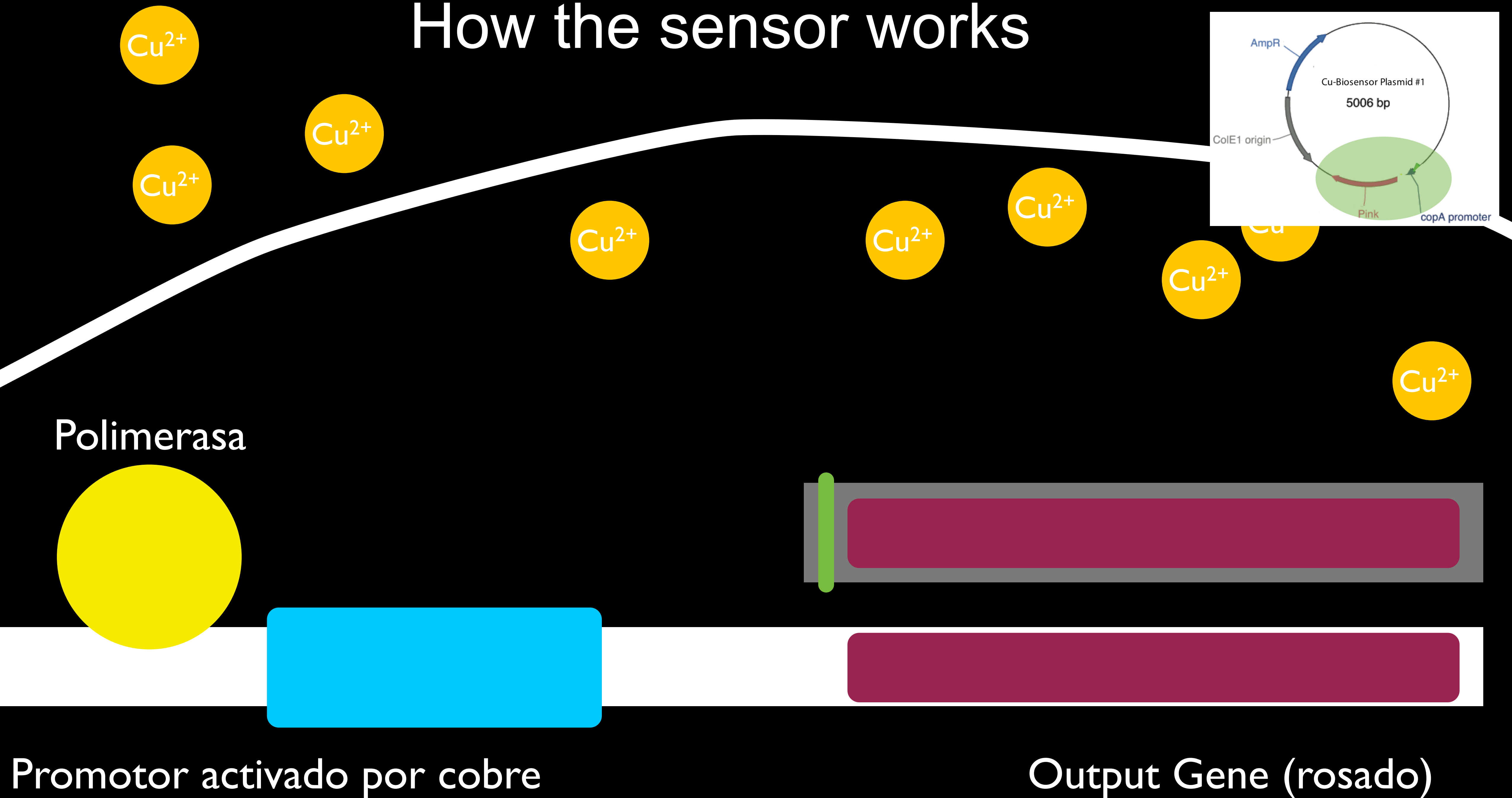
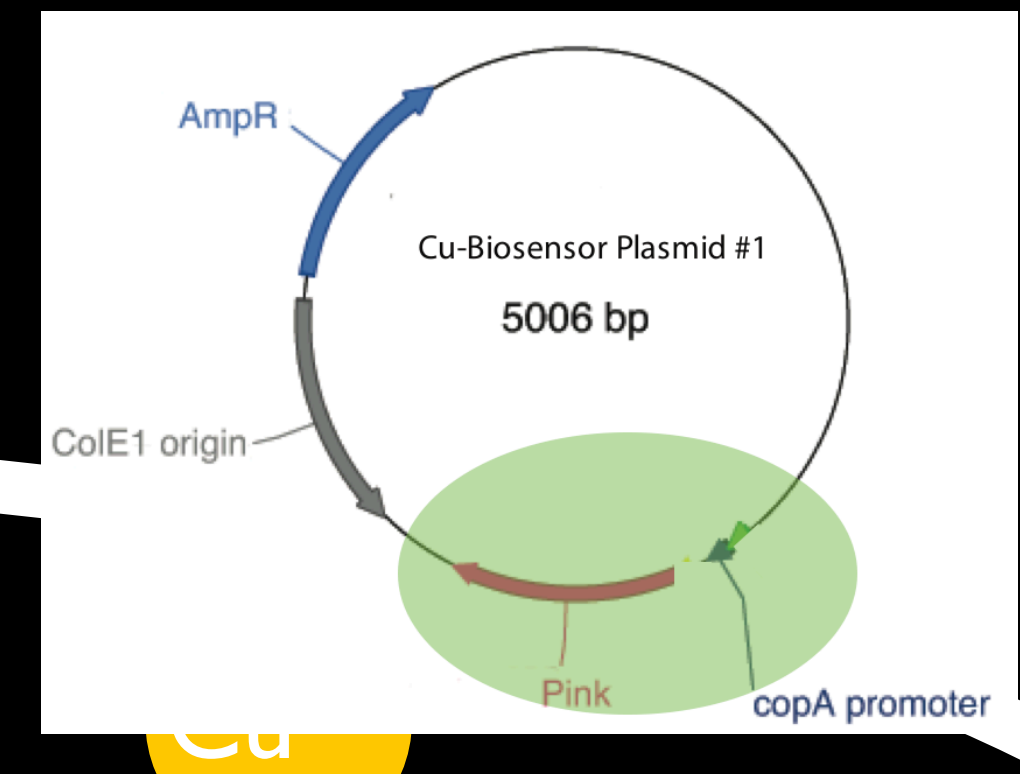
Como funciona el sensor



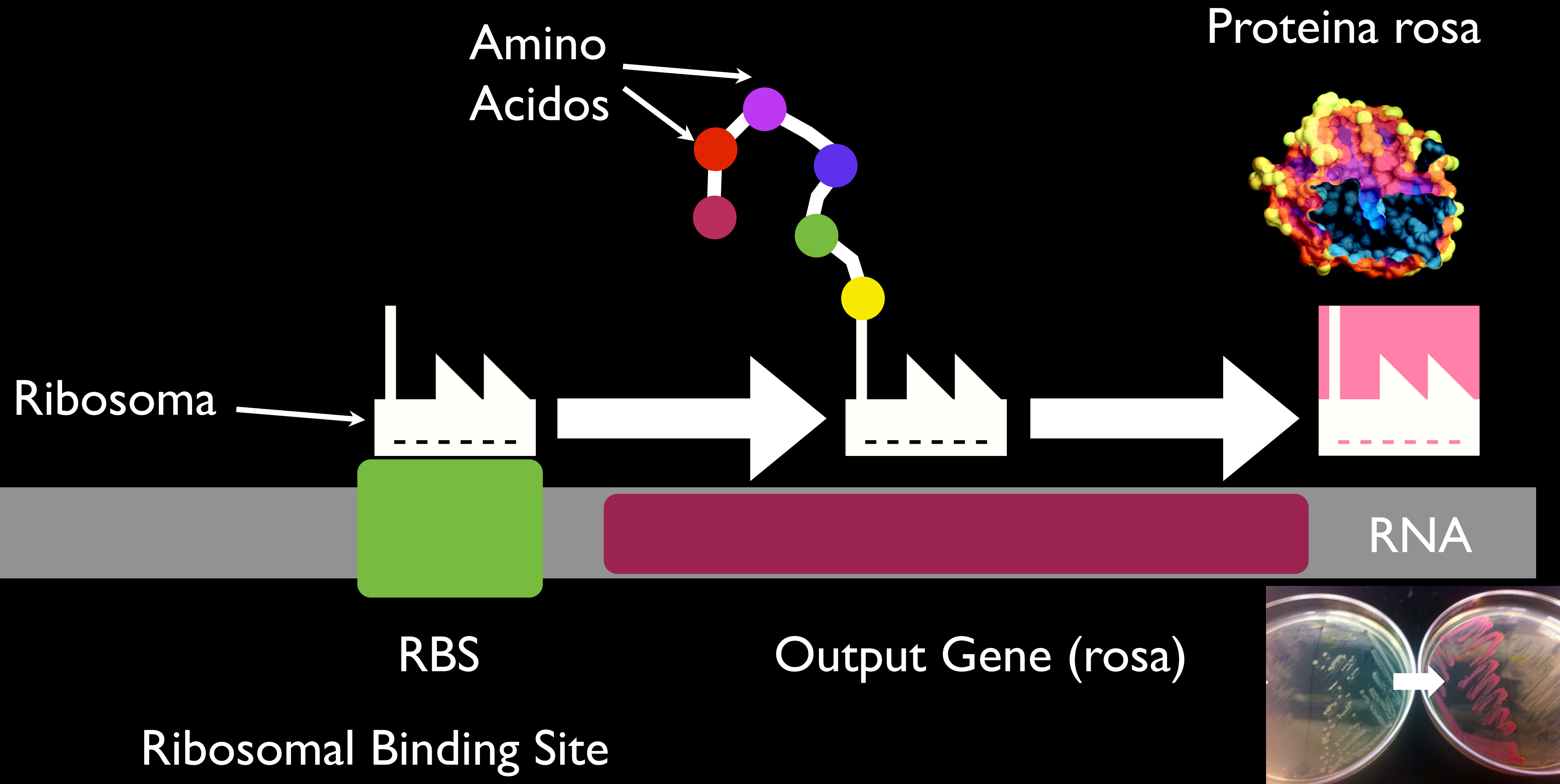
Como funciona el sensor



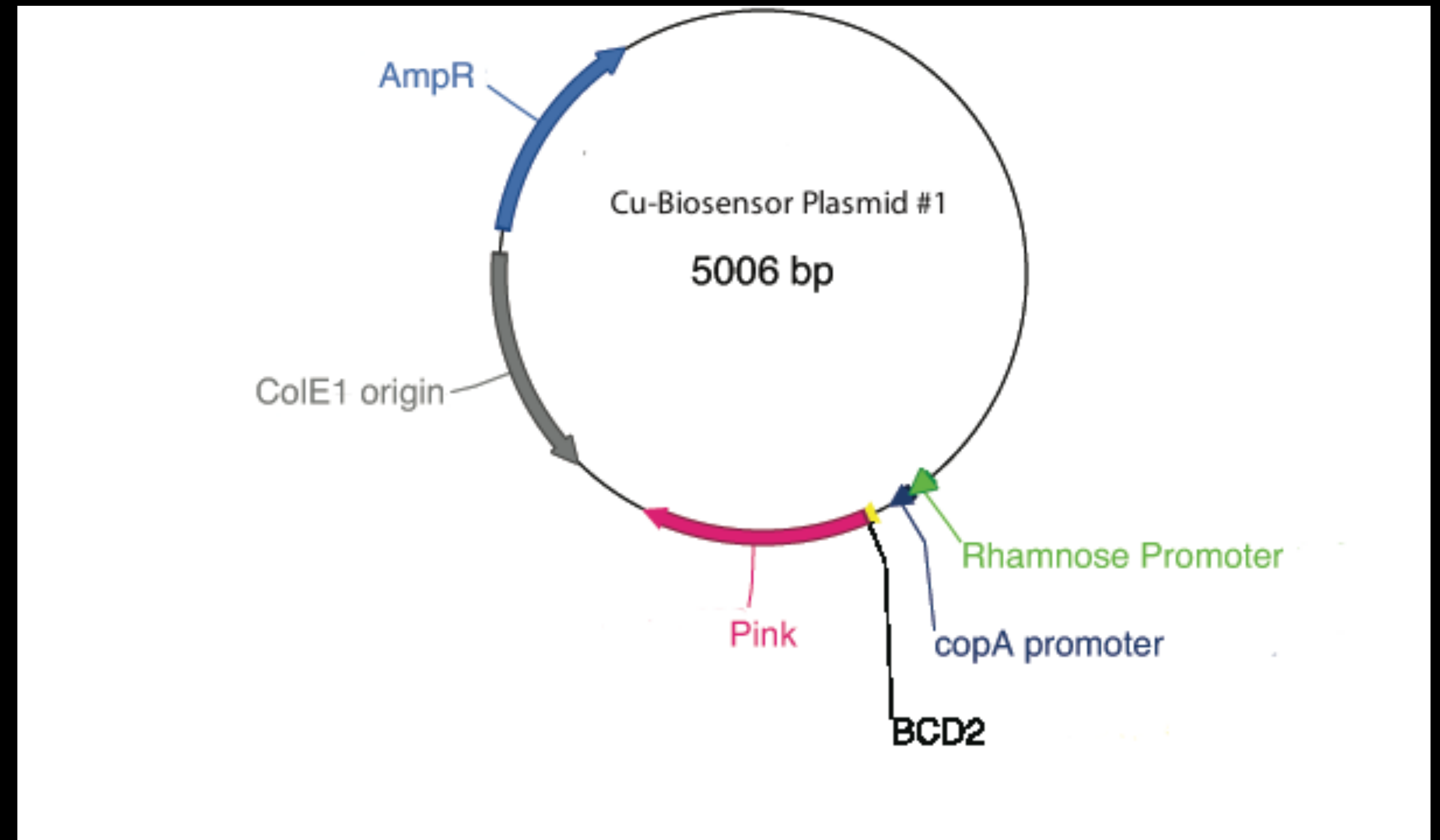
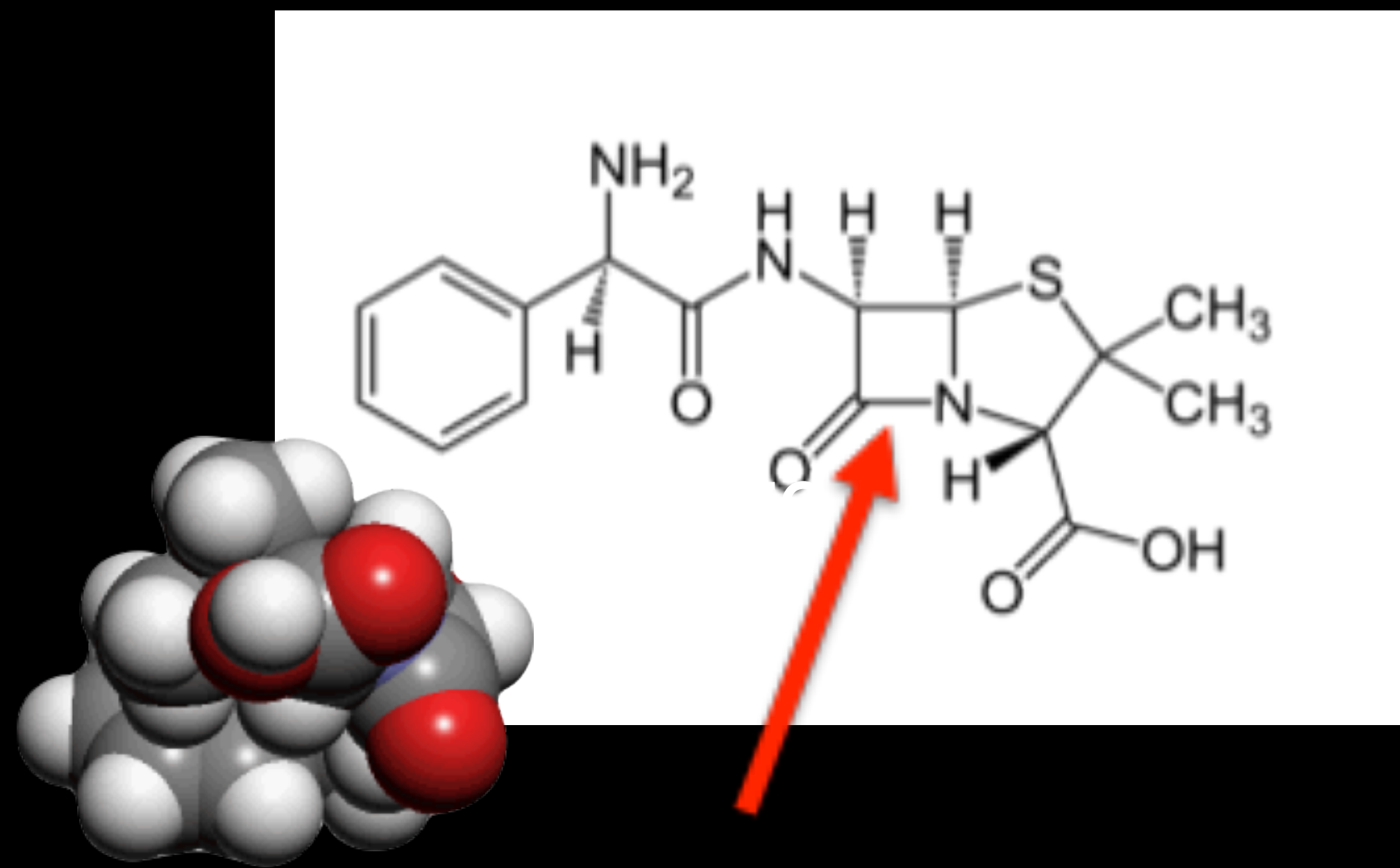
How the sensor works



Como funciona el biosensor



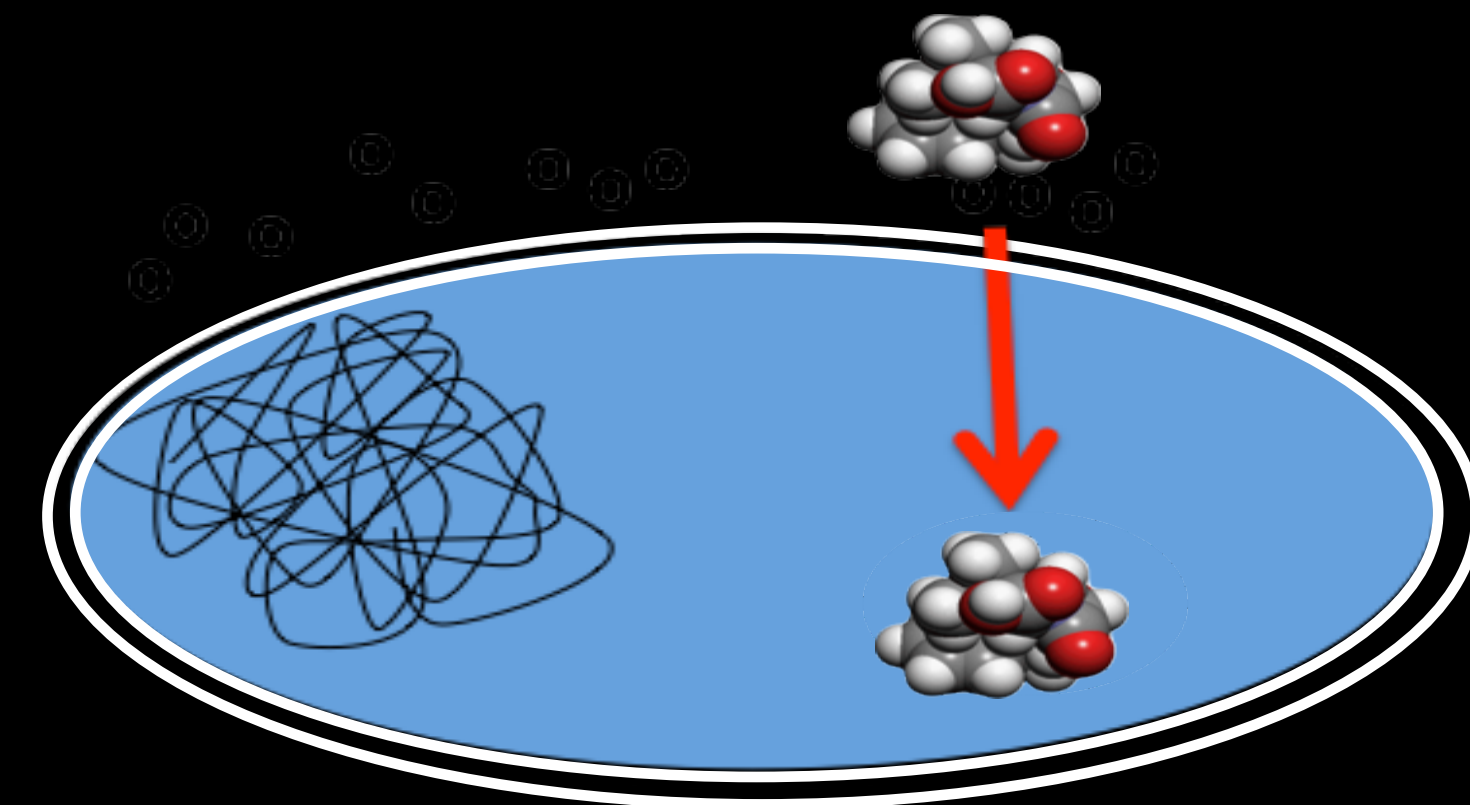
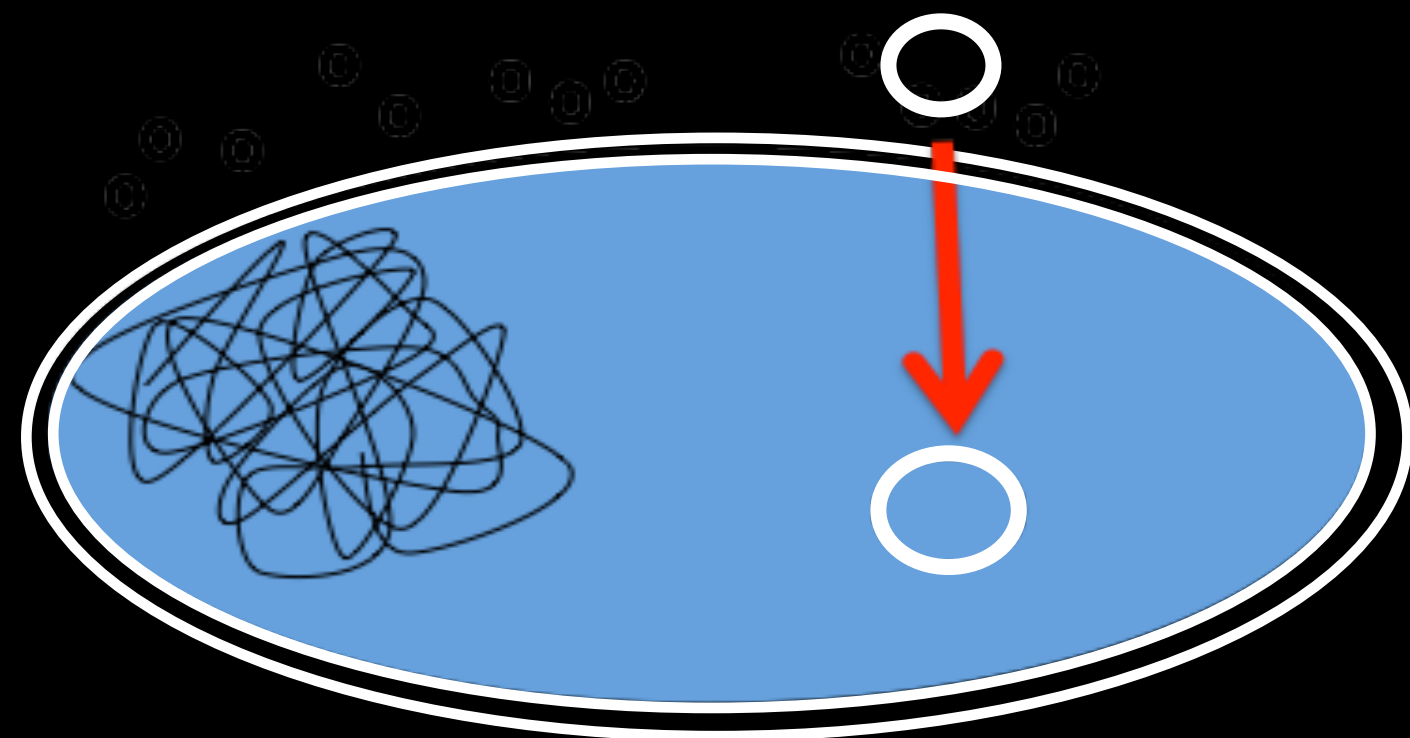
El gen ampR expresa una proteína que destruye la ampicilina (permitiendo crecer a la bacteria transformada)



Discusión de las condiciones experimentales I

Que podemos inferir y discutir sobre las condiciones de crecimiento (plating) de las células bacteriales ?

1. Como penetra el ADN en las células bacteriales?
2. Como funcionan los antibióticos?

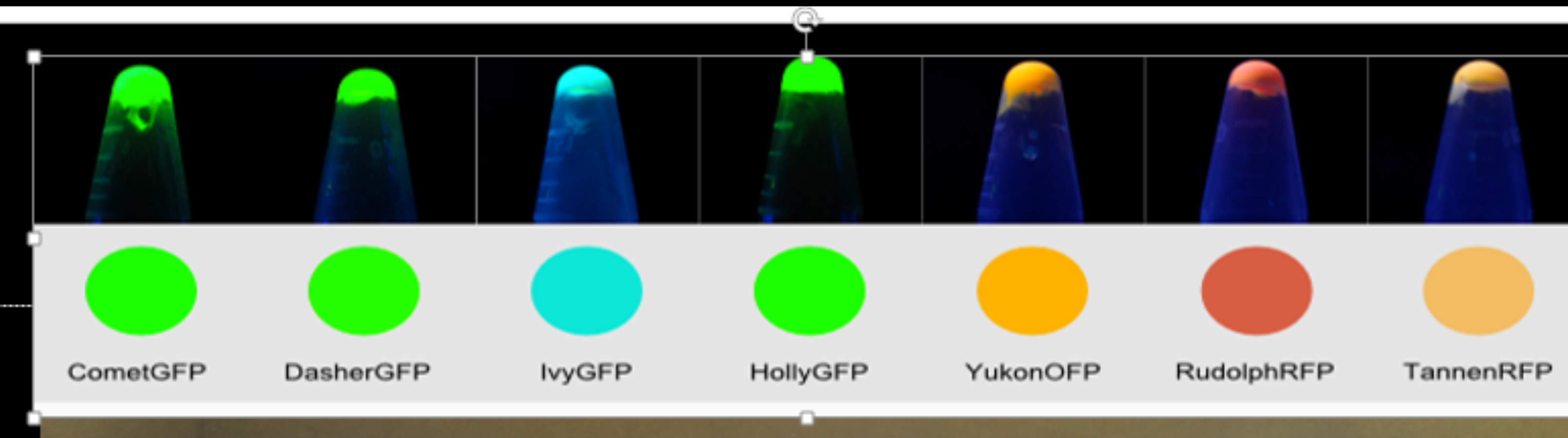
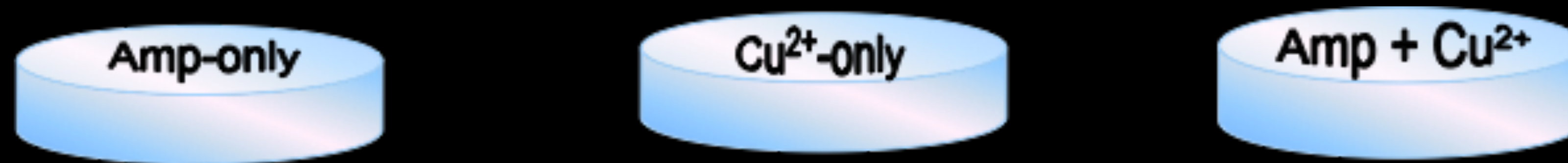


Discusión de las condiciones experimentales II

I. Condiciones de crecimiento (plating).

Tres diferentes condiciones de crecimiento

Que efecto va a tener cada uno sobre las bacterias que crezcan en cada uno



Podemos usar genes de diferentes proteínas/pigmentos

Que hemos aprendido sobre la biología sintética?

Abstracción

- No se necesita saber como funciona un plásmido para usarlo

Estandarización

- *Promotor copA*
- Proteínas fluorescentes

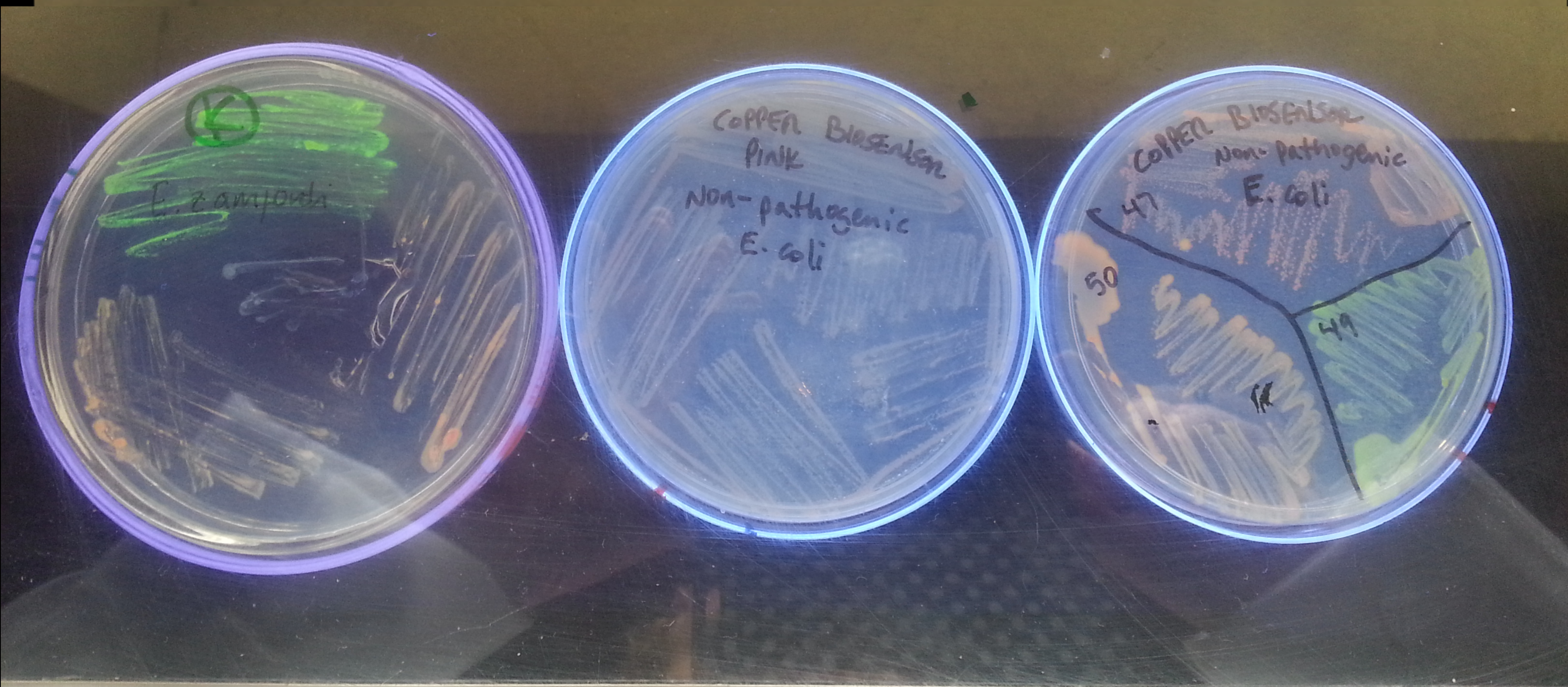
La biología como una tecnología

- Uso de células como biosensor



Discusión general

1. Podemos “re-escribir” el genoma de una microorganismo?
2. Podemos “reprogramar” su ruta biosintética para producir una proteína /enzima/ producto de interés?
3. Cuales son las implicaciones para la sociedad, para la evolución de las especies ?



Dr. Paul Jaschke
Endy Lab
Stanford University



Dr. Maria Mercedes Roca
Departamento de Bioingeniería y Biotecnología
Tecnológico de Monterrey – Campus Guadalajara,
Mexico

